



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán

GABRIEL ALEJANDRO HERNÁNDEZ NAVA

T E S I S

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

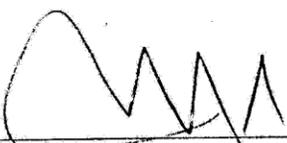
2013

La presente tesis titulada: **Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán** realizada por el alumno: **Gabriel Alejandro Hernández Nava** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

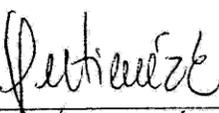
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR



DRA. M. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR



DR. EMILIANO LOEZA KUK

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio 2013.

PREVALENCIA DE *TOXOPTERA CITRICIDA* Y TASA DE ADQUISICIÓN DE *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.

Gabriel Alejandro Hernández Nava, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

La detección en 2000 de *Toxoptera citricida* (Tc) en la Península de Yucatán (PY) y su progresiva dispersión en el país justifica estudiar la prevalencia de éste vector en huertos citrícolas de PY; determinar la frecuencia de individuos virulíferos al *Citrus tristeza virus* (CTV) y establecer el tipo de aislamiento que dispersa con el fin de prevenir epidemias potenciales. Durante febrero 2011 y enero 2012 se censaron en PY cinco huertos con antecedentes positivos al CTV. De noviembre 2011-marzo 2013 se realizaron en 18 huertos seis muestreos dirigidos a focos positivos. Por árbol, se colectó independientemente 1-4 muestras de áfidos ápteros (10 insectos/muestra) así como su brote colonizado. En 2.5 años Tc se detectó en un rango de infestación del 6%(1/17)-35%(6/17), siendo mayor en invierno 2012. La colonización de Tc fue frecuente en limón persa (*C. latifolia*) con 72%(65/90), en comparación con 28%(25/90) de naranja Valencia (*C. sinensis*). La mayor colonización de Tc ocurrió en Yucatán y Campeche en brotes orientados al este-dosel con 44%(11/25) y 35%(23/65), respectivamente. El porcentaje de muestras Tc positivas tuvo un rango de 0%-75%, predominando en febrero y marzo 2012 con 75%(9/12 y 6/8, respectivamente). En total, de 1500 individuos colectados se estimaron 223 áfidos virulíferos (14.8%). El porcentaje de brotes positivos fue 57%(51/90). Hubo baja coincidencia de la condición positiva al CTV en la relación Tc-brote. En Campeche, la coincidencia no rebasó el 38%(3/8), mientras que en Yucatán no superó el 33%(1/3). Se secuenciaron cuatro muestras de áfidos positivos por PCR anidado los cuales fueron similares al aislamiento severo y moderado tipo T36(2/4) y T30(2/4), respectivamente. En diecisiete muestras de brotes positivos por PCR anidado prevaleció el aislamiento moderado tipo T30 (17/17). Esto confirma la baja prevalencia y virulificidad de Tc en PY, así como la prevalencia de un aislado de tipo moderado.

Palabras clave: CTV, *Toxoptera citricida*, *Citrus* sp.

PREVALENCE OF *TOXOPTERA CITRICIDA* AND RATE OF ACQUISITION OF *CITRUS TRISTEZA VIRUS* IN THE YUCATÁN PENÍNSULA.

Gabriel Alejandro Hernández Nava, M.C.

Colegio de Postgraduados, 2013

Detection in 2000 of *Toxoptera citricida* (Tc) in the Yucatan Peninsula (PY) and its gradual spread in the country justifies this study the prevalence of vector in citrus orchards of PY; determine the frequency of viruliferous individuals to *Citrus tristeza virus* (CTV) and set the type of insulation that disperses in order to prevent potential epidemics. During February 2011 and January 2012 were counted in five orchards with a history PY positive CTV. November 2011-March 2013 were conducted in 18 orchards six samplings aimed at positive foci. By tree, 1-4 samples were collected independently of wingless aphids (10 insects / sample) and its bud colonized. In 2.5 years Tc was detected in a range of infestation of 6% (1/17) -35% (6/17), being higher in winter 2012. The colonization of Tc was common Persian lime (*C. latifolia*) with 72% (65/90), compared with 28% (25/90) Valencia orange (*C. sinensis*). Higher colonization of Tc occurred in Yucatan and Campeche in buds oriented east-canopy with 44% (11/25) and 35% (23/65), respectively. The percentage of samples positive Tc ranged from 0% - 75%, predominantly in February and March 2012 with 75% (9/12 and 6/8, respectively). A total of 1500 individuals collected viruliferous aphids were estimated 223 (14.8%). The percentage of positive shoots was 57% (51/90). There was low coincidence of CTV-positive status in the relationship Tc-bud. In Campeche, the match did not exceed 38% (3/8), while in Yucatan did not exceed 33% (1/3). Four samples were sequenced by nested PCR positive aphids which were similar to the isolation severe and moderate type T36 (2/4) and T30 (2/4), respectively. In seventeen samples positive by nested PCR bud prevailed T30 tempered type insulation (17/17). This confirms the low prevalence and PY virulificidad of Tc, and the prevalence of a moderate type isolate.

Keywords: CTV, *Toxoptera citricida*, *Citrus* sp.

DEDICATORIA

A Georgina, Imelda y Ángela

Con mucho amor

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), al Colegio de Postgraduados y al Proyecto “Implicaciones epidemiológicas del CTV en el sistema Vector-Planta: bases biológicas y cuantitativas para la aplicación de la Campaña en México” (PM09-4002).
- A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de la Península de Yucatán por el apoyo logístico. A Edwin Hernández por su apoyo durante los muestreos y por su amistad.
- A miembros del GIIIC, principalmente Sarah, Gerardo, Noemí, Santiago, Jorge, Fabiola y personas que me apoyaron desinteresadamente en la realización del proyecto.

A mi Consejo Particular: Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa y Dr. Emiliano Loeza Kuk.

A todos mis profesores del Programa de Fitopatología.

A mis amigos con los que compartí muchos momentos: Bety; Adriana, Isis, Emma, Cele, Ale, Viky, Lore, Balta, Mado, Nay, Mario.

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE CUADROS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
LITERATURA CITADA	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
CADENA CITRÍCOLA MEXICANA.....	4
INFORMACIÓN GENÓMICA Y VARIABILIDAD DE CTV.....	7
DETECCIÓN Y VARIABILIDAD POBLACIONAL DE CTV CON ÉNFASIS EN TÉCNICAS MOLECULARES.....	10
RELACIÓN VIRUS-PLANTA-VECTOR	13
El vector.....	13
El virus.....	16
LITERATURA CITADA	16
III. PREVALENCIA DE <i>TOXOPTERA CITRICIDA</i> Y TASA DE ADQUISICIÓN DEL <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.....	24
RESUMEN	24
ABSTRACT.....	25
3.1. INTRODUCCIÓN.....	26
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	26
Selección de huertos	26
Colecta de muestras	29
Conservación de las muestras	30
Identificación de áfidos	32
Detección de CTV en planta y vector	32
Extracción RNA total en áfidos	33

Extracción RNA total en tejido vegetal.....	34
Cuantificación de ARN	35
Síntesis de cDNA en áfido y planta	36
Detección de CTV por PCR en planta.....	36
Detección de CTV por PCR anidado en planta	37
Detección de CTV por PCR anidado en áfido	37
Detección de CTV por RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) en áfido.....	37
Estimación de áfidos virulíferos	38
Secuenciación de muestras.....	38
Mapas de detección de CTV.....	39
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Infestación regional de <i>T. citricida</i> en huertos citrícolas.....	40
Detección del CTV en muestras de áfidos	42
Detección del CTV en brote.....	45
Coincidencia CTV en <i>T. citricida</i> /brote.....	45
3.4. CONCLUSIONES.....	54
LITERATURA CITADA.....	55
APÉNDICE.....	59
APÉNDICE A.1. Materiales necesarios para colecta de áfidos y tejido vegetal en brotes de cítricos.	59
APÉNDICE A.2. Extracción de RNA total en muestras de áfidos adultos ápteros (protocolo modificado por Freitas-Astúa, 2003).....	60
APÉNDICE A.3. Extracción de RNA total en muestras de tejido vegetal (Harris, 2002). 61	
APÉNDICE A.4. Valores de concentración y calidad de RNA total en áfidos.....	62
APÉNDICE A.5. Valores de concentración y calidad de RNA total en planta.....	66
APÉNDICE A.6. Detección de CTV en planta por RT-PCR, PCR anidado.....	68
APÉNDICE A.7. Detección de CTV en áfidos por RT-PCR, PCR anidado, qRT-PCR.....	71
APÉNDICE A.8. Detección de muestras de áfidos positivas al CTV por electroforesis en gel de agarosa.	74
APÉNDICE A.9. Detección de muestras de brotes positivos al CTV por electroforesis en gel de agarosa.	76
APÉNDICE A.10. Secuencias obtenidas de muestras de áfidos y brotes positivos al CTV.....	79

INDICE DE FIGURAS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

- Figura 1. Producción de cítricos a nivel mundial en 2011. Fuente: FAO 2013. 5
- Figura 2. Superficie citrícola de México. Fuente: Estadísticas del sistema producto cítricos. 2010. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/index.php?portal=. (Consultado el 07 mayo 2012)..... 6
- Figura 3. Organización genómica del CTV, marcos abiertos de lectura y proteínas generadas. Fuente: Tatineni *et al.* 2011..... 8
- Figura 4. Modelo de mecanismo de recombinación de RNA viral. La replicasa viral se encarga de generar copias del virus (a); se generan nuevas cadenas de RNA viral a partir de una cadena molde (b); la replicasa detiene la síntesis de la cadena (c); toma como molde una secuencia de ARN distinta a la primera (d), se genera una cadena nueva información genética diferente de las cadenas molde (e). Fuente: Sztuba-Solinska *et al.*, 2011..... 10
- Figura 5. Estados con detección de *T. citricida*. En color rojo se indica zonas con detección del áfido. Fuente: SINAVEF 2012. 15

III. PREVALENCIA DE *TOXOPTERA CITRICIDA* Y TASA DE ADQUISICIÓN DEL *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

- Figura 1. Ubicación espacial de las huertas seleccionadas para detección e identificación de aislamientos CTV. 29
- Figura 2. Aspecto de brote de cítrico colonizado por áfidos y colecta manual de brote. Notar en A, B y C que los brotes presentan daños por alimentación consistente del áfido como enrollamiento, acortamiento de entrenudos y clorosis; así mismo la predominancia del insecto por el envés de las hojas asociado a nervadura central. En D, E y F se muestra la escisión del brote colonizado, posteriormente la separación de muestras de áfidos del tejido vegetal en campo y la deposición de áfidos en frascos con alcohol al 70%. 31

Figura 3. Identificación de <i>Toxoptera citricida</i>. Apreciarse en A el patrón de pigmentación en antenas y en B detalle de ala anterior. Fuente: Ficha Técnica Pulgón café de los Citricos. SINAVEF. 2012.	32
Figura 4. Extracción de RNA total en áfidos utilizando brocas estériles.	34
Figura 5. Localización de árboles positivos a CTV (Domínguez-Monge, 2012). A) Ubicación de árboles positivos y negativos a CTV en huerto Esperanza-4, Dzan, Yucatán. B) Ubicación de árboles positivos y negativos a CTV en huerto Castamay, Castamay, Campeche.	39
Figura 6. Infestación de Tc a nivel regional en la Península de Yucatán y relación de muestras de áfidos positivas al CTV. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	41
Figura 7. Detección del CTV en muestras de áfidos ápteros por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de <i>C. sinensis</i> confirmado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y <i>C. sinensis</i> negativo validado por inmunopresión-Elisa. Líneas 1, 8, 10 y 11 muestras positivas al virus colectadas en huerto Castamay, Campeche 2012. MW= 100 pb (Promega).	43
Figura 8. Valores máximos y mínimos de individuos de <i>T. citricida</i> (Tc) virulíferos y estimación de número de áfidos positivos en muestreo dirigido en árboles de cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	44
Figura 9. Detección del CTV en muestras de brotes por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de <i>C. sinensis</i> con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y <i>C. sinensis</i> negativo validado por inmunopresión-Elisa. Líneas 1-5 muestras positivas al virus colectadas en huerto Castamay, Campeche 2012. MW= 1000 pb (Promega).	45
Figura 10. Comparación de muestras positivas al CTV de Tc y brote de cítricos. El muestreo fue dirigido a árboles de cítricos en el periodo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	47

Figura 11. Infestación de <i>T. citricida</i> por punto cardinal del dosel del árbol, bajo un muestreo dirigido a brotes de cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	49
Figura 12. Mapa espacial interpolado de infestación de <i>T. citricida</i> y distribución de dos aislamientos del CTV en limón persa (<i>C. latifolia</i>). Huerto Castamay, Campeche, 2012.	50
Figura 13. Mapa espacial interpolado de infestación de <i>T. citricida</i> y distribución de dos aislamientos del CTV en naranja Valencia (<i>C. sinensis</i>). Huerto Esperanza-4, Yucatán, 2012.	51

INDICE DE CUADROS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1. Principales países productores de cítricos.....	4
Cuadro 2. Métodos de diagnóstico utilizadas para la detección del CTV.	11
Cuadro 3. Pruebas de detección de CTV en áfidos (Hemíptera). Se mencionan distintas técnicas para la detección de la partícula viral en vector.....	12

III. PREVALENCIA DE *TOXOPTERA CITRICIDA* Y TASA DE ADQUISICIÓN DEL *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Cuadro 1. Localización y topología de huertos de cítricos para muestreos de <i>T. citricida</i> en la Península de Yucatán, México.	28
Cuadro 2. Infestación de <i>T. citricida</i> y detección del CTV en muestreos dirigidos a huertos y árboles de cítricos en la Península de Yucatán.	40
Cuadro 3. Infestación de <i>T. citricida</i> y detección del CTV en censo de cinco huertos cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo invierno de 2011 y 2012.	42
Cuadro 4. Coincidencia de muestras de <i>T. citricida</i> (Tc.) y brote en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	46
Cuadro 5. Infestación y adquisición del CTV por <i>T. citricida</i> por tipo de cítrico en la Península de Yucatán. Muestreo dirigido a brotes de cítricos seleccionados por antecedentes históricos de condición positiva al virus. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.	48

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El ingreso y detección de *T. citricida* en el 2000 en la Península de Yucatán no ha implicado hasta el presente la ocurrencia de epidemias de alta intensidad a nivel parcelario, ni la ocurrencia de una alta prevalencia del virus a nivel regional (Domínguez-Monge, 2010). Es ampliamente reconocido el impacto que *T. citricida* ha tenido en la selección de aislamientos de tipo severo y la ocurrencia de síntomas de declinamiento (Halbert y Brown, 1996). En la Península de Yucatán no existen evidencias de síntomas de tipo severo como declinamiento, prevaleciendo infecciones virales en condiciones asintomáticas (Loeza-Kuk *et al.*, 2008; Rivas-Valencia *et al.*, 2010 y Domínguez-Monge, 2010).

Estudios recientes han confirmado la ocurrencia de haplotipos del CTV en planta y *T. citricida*. Rivas-Valencia *et al.*, (2010) demostró la ocurrencia de hasta tres haplotipos en planta a nivel parcelario en el estado de Yucatán en un periodo de 3 años. En ese trabajo se encontraron cambios de frecuencias entre dos haplotipos en dos estaciones productivas. Por otro lado, Loeza-Kuk (2008) evidenció la ocurrencia de haplotipos del CTV en *T. citricida* sin coincidencia con los haplotipos del brote de la planta colonizada. Estos resultados sugieren que *T. citricida* pudiera estar involucrado en cambios en la estructura de la población del virus y que la ocurrencia de eventuales variantes de tipo severo pudieran causar epidemias de alta intensidad.

El CTV ha sido el responsable de la muerte de más de 20 millones de cítricos en el continente Americano, principalmente en países como Brasil, Argentina y Venezuela (Rocha-Peña *et al.*, 1995), lo que indica la potencialidad del virus para causar epidemias de alto impacto económico. Estas epidemias no son recientes, en parte por el cambio de portainjertos tolerantes en sustitución al naranjo agrio. Sin embargo, la variabilidad del virus sugiere su posible adaptación a cambios de manejo, entre ellos al varietal, sugiriendo estudios de riesgos de manera permanente para el CTV.

Finalmente, la detección de *T. citricida* en estados productores de cítricos, particularmente de la vertiente del Pacífico, indican la movilidad del vector hacia otras

regiones citrícolas importantes. Por otra parte, en la vertiente del golfo, *T. citricida* se encuentra en Tabasco y sur de Veracruz (SENASICA, 2012). Por tanto es necesario conocer los niveles de infestación y prevalencia de *T. citricida* en un contexto regional, para identificar la relación *T. citricida*/brote y establecer que aislamientos virales están asociados a *T. citricida*. En este contexto, el presente trabajo se propuso con los siguientes objetivos:

Determinar el nivel de infestación de *Toxoptera citricida*, la condición virulífera al *Citrus tristeza virus* en huertos citrícolas comerciales de la Península de Yucatán y la relación del vector con tipos de aislamientos virales.

LITERATURA CITADA

- Domínguez-Monge S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 60 p.
- Loeza-Kuk, E. 2008. Características epidemiológicas y moleculares de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 103 p.
- Loeza-Kuk E., D. L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, M. A. Gutiérrez-Espinosa, W. Cintra de Jesús Junior, A. Villegas-Monter, N. Arno-Wulff, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2008. Detection of *Citrus sudden death-associated virus* and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. *Agrociencia* 42: 669-678.
- Rivas-Valencia P. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. 131 pp.
- Rivas-Valencia P., E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, N. Ruiz-García, D. L. Ochoa-Martínez, A. Gutiérrez-Espinoza, y V. Febres. 2010. Análisis espacio-temporal de

aislamientos del *Citrus tristeza virus* en Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:493-507.

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

SENASICA. 2012. Estatus fitosanitario para pulgón café de los cítricos (PCC) en México. SAGARPA, SENASICA. Consultado en línea el 26 de septiembre de 2012 en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1010>.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

CADENA CITRÍCOLA MEXICANA

La cadena citrícola a nivel mundial es considerada una de los más importantes, con una producción aproximada a 116 millones de toneladas producidas tan solo en 2011. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura, (FAO por sus siglas en inglés), hasta 2011 se consideran como principales productores China, Brasil, Estados Unidos de Norteamérica y México. Los dos primeros producen casi el triple de sus competidores más cercanos (Cuadro 1) (FAO, 2013). Estados Unidos de Norteamérica y España, deben su alta producción a la tecnificación de sus cultivos, mientras que en países como Brasil, China y México, su producción es favorecida por características geográficas, climatológicas e hidrológicas. Actualmente, Brasil exhibe un desarrollo tecnológico sobresaliente (Fundación Produce Sinaloa, 2009). Datos de 2011 indican que los cítricos más importantes son: la naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (60%) y mandarina (*C. reticulata*) (21%) (Fig. 1) ya que aportan más del 80 % de la totalidad de cítricos (FAO, 2013).

Cuadro1. Principales países productores de cítricos.

País	Toneladas
China	23,842,223.00
Brasil	21,942,570.00
Estados Unidos de Norteamérica	9,796,690.00
México	7,031,084.00
India	6,875,000.00

Fuente: FAO, 2013.

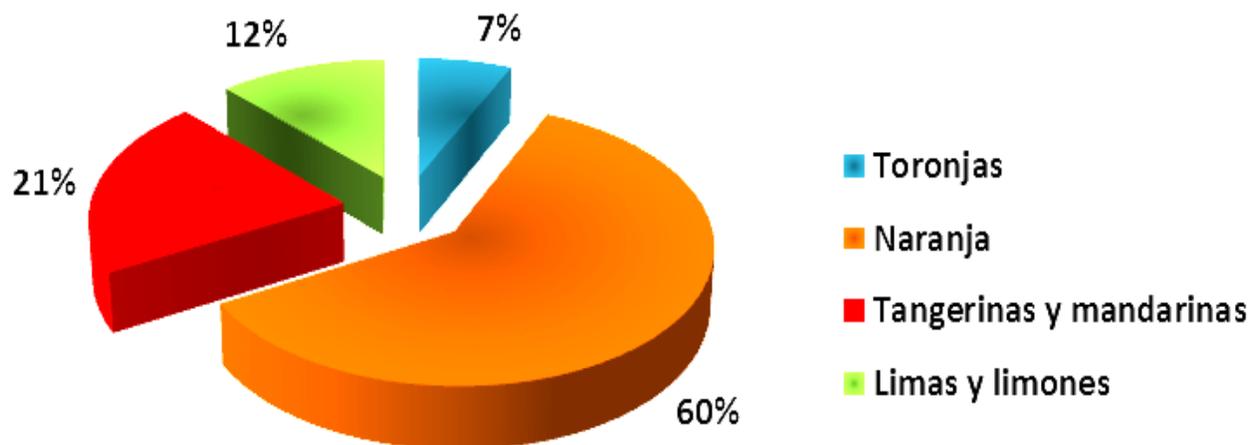


Figura 1. Producción de cítricos a nivel mundial en 2011. Fuente: FAO 2013.

El valor de la citricultura en México como país citricultor es relevante ya que ocupa el cuarto lugar a nivel mundial. La cadena citrícola representa una actividad agrícola importante. La diversidad de clima y de suelos ha favorecido al cultivo de diversas especies de cítricos con una calidad competitiva a la de otros países. La superficie estimada es 549 mil hectáreas cultivadas de cítricos, con una producción anual de 6 millones 851 mil toneladas de fruta y un valor estimado de 8 mil 50 millones de pesos. La relevancia de este cultivo está relacionada con los ingresos por la comercialización y con la generación de millones de empleos directos e indirectos. Se estima que la actividad citrícola genera una dependencia de 200 mil familias (Fundación Produce Sinaloa, 2009). Informes del IICA (2010), indican que de esta actividad dependen 69 mil productores y que se generan 154 mil empleos directos. Las especies que integran la cadena productiva identificada por SAGARPA como sistema producto Cítricos son: naranja (*C. sinensis*), limón (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle) y *C. latifolia*), toronja (*C. paradisi* Macf.) y mandarina (*C. reticulata*). En total, de 23 estados citricultores, seis son los que concentran el 75% de la superficie: Veracruz, San Luis Potosí, Michoacán, Tamaulipas, Colima y Nuevo León. Éstos contribuyen con 79% de la producción nacional, siendo Veracruz el mayor productor (Fig. 2) (IICA, 2010).

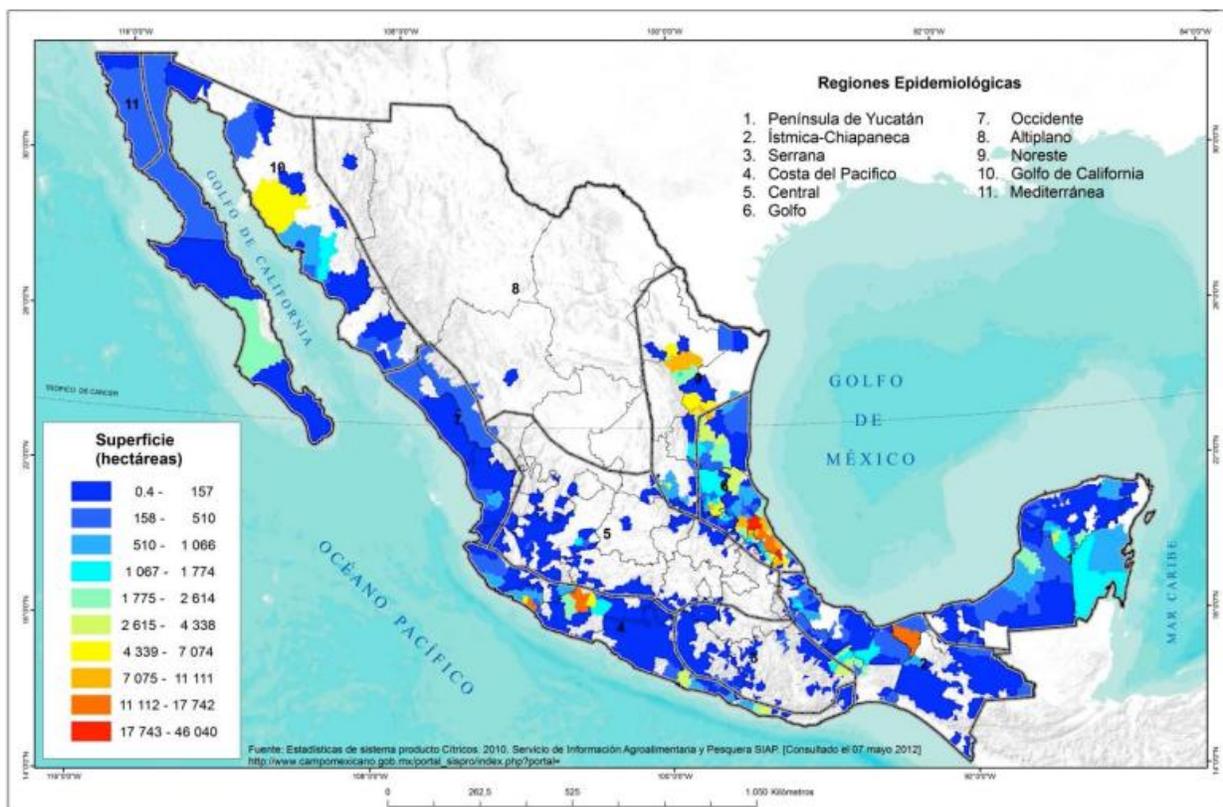


Figura 2. Superficie cítrica de México. Fuente: Estadísticas del sistema producto cítricos. 2010. Servicio de información Agroalimentaria y Pesquera SIAP. http://www.campomexicano.gob.mx/portal_sispro/index.php?portal. (Consultado el 07 mayo 2012)

De la superficie establecida de cítricos, 63% está cultivado en condiciones de temporal y el resto bajo condiciones de riego. El 68.5% está destinado a naranja (*C. sinensis*), 20.5% corresponde a limón mexicano (*C. aurantifolia*), el 5.2% a limón persa (*C. latifolia*) y 5.8% mandarinas (*C. reticulata*), tangerinas (*C. reticulata X C. paradisi*) y toronja (*C. paradisi*). Del total de la producción nacional, el 88% se dirige al consumo interno y el resto a la exportación, el destino principal es Estados Unidos de Norteamérica. En los próximos años el escenario productivo puede cambiar ya que Europa es un mercado potencial para la exportación, principalmente de limón persa (*C. latifolia*).

En la actualidad, la cadena citrícola mexicana enfrenta un alto riesgo fitosanitario ya que varias plagas afectan los cítricos, destacando el HLB (Huanglongbing) en los últimos cuatro años. Otros riesgos potenciales son el CVC (*Xilella fastidiosa* subsp. *pauca*), cancro (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*) y mancha negra (*Guignardia citricarpa*), presentes en otros países del continente. En este contexto, el *Citrus tristeza virus* fue una de las primeras amenazas a la producción reportándose en México en 1986 (Cepeda-Nieto and Barrera-Saldana, 1997). En contraste a las pérdidas de más de 100 millones de árboles muertos a nivel mundial (Müller *et al.*, 2000 y Cambra *et al.*, 2000), con 21 millones tan solo en Brasil, Argentina y Venezuela (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Cambra *et al.*, 2000) en México la ocurrencia de poblaciones del virus muestra una aparente baja incidencia, con predominancia de aislamientos de tipo moderado. Estudios recientes demuestran cambios en frecuencias de haplotipos en planta con indicios de dispersión en condiciones de campo (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). Adicionalmente, *T. citricida*, reconocido como el principal vector del CTV, detectado en 2000 en la Península de Yucatán (Michaud y Álvarez, 2000) ha continuado su dispersión en el país, con detecciones en 2012 en estados situados en las costas del Pacífico. Esto obliga al conocimiento de la estructura poblacional del virus en un contexto regional y a identificar la relación aislamiento virus-vector para fines de vigilancia epidemiológica. Con esto se pretende prevenir potenciales epidemias severas en la citricultura mexicana.

INFORMACIÓN GENÓMICA Y VARIABILIDAD DE CTV

El genoma del CTV está constituido por una cadena que se replica en sentido positivo con 12 Open Reading Frame (ORF's) o marcos abiertos de lectura, que codifican hasta 19 proteínas. En su extremo 5' está la información encargada de codificar proteínas requeridas en la replicación del virus, tales como RNA polimerasa-RNA dependiente, helicasa, metiltransferasa y proteasa (Tatineni *et al.*, 1999). El extremo 3' contiene la información encargada de codificar proteínas involucradas en la interacción del CTV con su hospedante (Fig. 3) (Lu *et al.*, 2004; Gowda *et al.*, 2000).

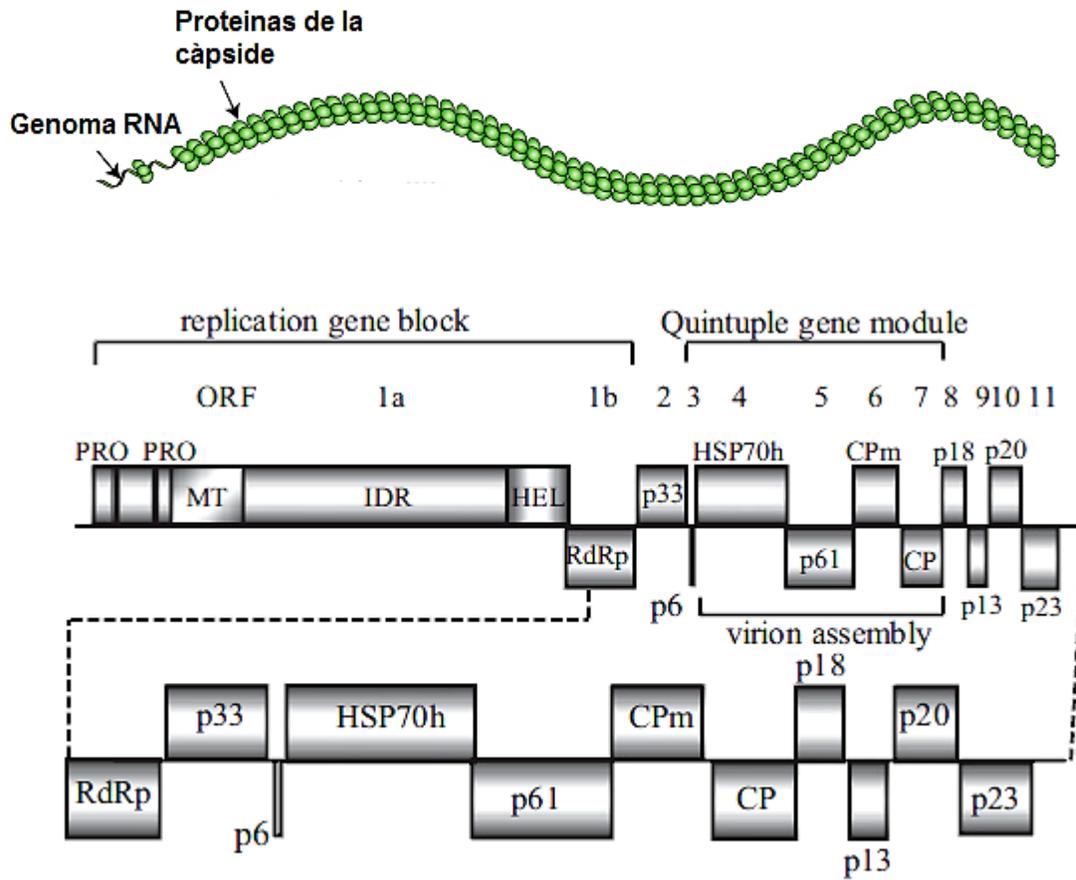


Figura 3. Organización genómica del CTV, marcos abiertos de lectura y proteínas generadas. Fuente: Tatineni *et al.* 2011.

Por la complejidad en su genoma, se realizaron estudios en sus marcos de lectura. Un ORF de gran importancia es el que codifica proteínas de la cápside del virus, conocidas como p25 y p27, constituyendo la capa mayor y la capa menor, respectivamente. Los genes encargados en codificar estas proteínas se estudiaron para caracterizar molecularmente aislamientos de CTV. La proteína p23 también es utilizada para la caracterización de CTV. Esta proteína tiene la característica de no encontrarse en ningún otro virus de la familia Closteroviridae (López *et al.*, 2000). La función de esta proteína es controlar la acumulación de cadena de ARN del virus en la célula del hospedante durante su replicación (Santanarayana *et al.*, 2002), induce síntomas (Ghorbel *et al.*, 2001) y es supresor de RNA de interferencia (Lu *et al.*, 2004). Los genes que codifican las proteínas p33, p18 y p13, anteriormente con funciones

desconocidas (Rivas-Valencia, 2008), actualmente se conoce que están implicados en procesos de infección y movimiento en las células del hospedante (Tatineni *et al.*, 2008). Diversos factores contribuyen a esta diversidad, como la infección constante del hospedante por varios aislamientos y la recombinación de ARN entre variantes (Roy y Brlansky, 2004; Vives *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2006).

El conocimiento del genoma del CTV permitió desarrollar híbridos recombinantes de aislamientos moderados y severos por sustitución del gen p23 y la región no traducible del extremo 3', demostrando la posibilidad potencial de que por ingeniería genética se puedan mitigar epidemias severas al reducir la agresividad de aislamientos virales (Albiach-Martí *et al.*, 2010).

El número de ORF's que codifican proteínas y la variabilidad en el genoma del CTV pueden indicar el grado evolutivo del virus, ya que los virus fitopatógenos han coevolucionado con sus hospedantes (Lovisoló *et al.*, 2003). En cítricos se hace evidente estos **procesos coevolutivos planta-virus**, por el carácter perenne del cultivo y por tanto en constante proceso de reinfección viral (Roy y Brlansky, 2004; Vives *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2006).

Estudios indican que la selección negativa, recombinación de RNA y el flujo de genes son factores importantes que impulsan la evolución del CTV, impactando en la variabilidad de codones involucrados en la síntesis de proteínas. Cheng y colaboradores (2012) usaron los codones implicados en la producción de proteínas del CTV, como herramienta para determinar procesos evolutivos, demostrando que no hay una elevada variabilidad de codones entre virus, pero sí una alta semejanza entre codones de CTV y su hospedante, lo que sugiere que la selección de codones del hospedante puede afectar la evolución del virus, demostrando la interacción entre el patógeno y su hospedante.

La recombinación de RNA viral reordena los genes virales, generando mutaciones (Fig. 4). La recombinación ocurre durante la replicación del virus. El proceso está influenciado por la enzima replicasa viral, por una pausa durante la elongación de la molécula de RNA. Este proceso es frecuente en una población viral y

entre distintas cepas virales, por tanto, este mecanismo es uno de los principales factores responsables del surgimiento de nuevas variantes, algunas de ellas más peligrosas (Khatchikian *et al.*, 1989, Sztuba-Solinska *et al.*, 2011). En CTV, considerado como el virus fitopatológico de mayor tamaño genómico, se evidenció la recombinación de RNA en marcos de lectura abierto, expresados por RNAs subgenómicos, de capa proteica y de proteína p20 (que interviene en la formación de cuerpos de inclusión y con el transporte de la partícula) en poblaciones virales provenientes de España y California (Rubio *et al.*, 2001).

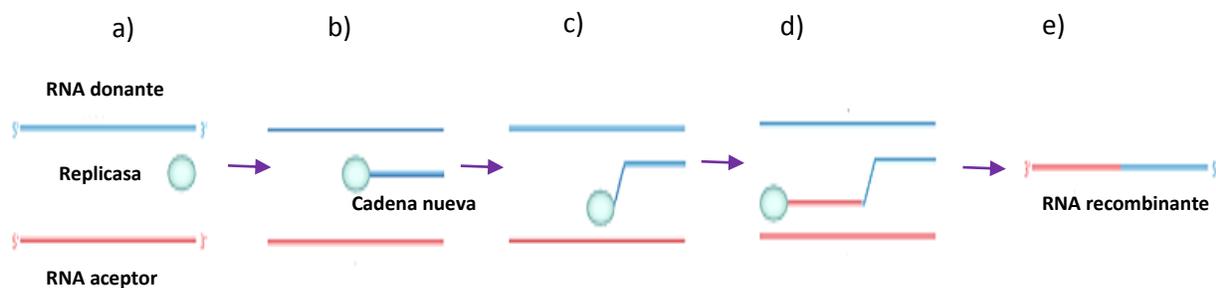


Figura 4. Modelo de mecanismo de recombinación de RNA viral. La replicasa viral se encarga de generar copias del virus (a); se generan nuevas cadenas de RNA viral a partir de una cadena molde (b); la replicasa detiene la síntesis de la cadena (c); toma como molde una secuencia de ARN distinta a la primera (d), se genera una cadena nueva información genética diferente de las cadenas molde (e). Fuente: Sztuba-Solinska *et al.*, 2011.

Entender la interacción virus-hospedante y virus-vector requiere la comprensión de la estructura poblacional de la partícula viral y sus mecanismos de variación. Es evidente que el conocimiento del genoma del CTV y de los procesos evolutivos de selección son útiles para el entendimiento de los procesos epidémicos.

DETECCIÓN Y VARIABILIDAD POBLACIONAL DE CTV CON ÉNFASIS EN TÉCNICAS MOLECULARES

Para determinar la variabilidad de la población de asilamientos de CTV es necesario un diagnóstico rápido y eficiente que permita tomar medidas fitosanitarias con el fin de evitar epidemias intensas. Las pruebas hasta ahora realizadas, tienen bondades y limitaciones propias; sin embargo, el factor ponderante es la sensibilidad

para detectar a la partícula viral. En los últimos años se ha destacado el uso de técnicas moleculares para la detección de CTV (Cuadro 2). En planta se ha realizado SSCP (Rivas-Valencia, 2008), PCR anidado (Loeza-Kuk *et al.*, 2008), PCR y PCR por inmunopresión (Nolasco *et al.*, 1993), RT-PCR con iniciadores específicos (Hilf *et al.*, 2005) y RFLP con producto de RT-PCR del gen de la capa proteica utilizando enzimas de restricción Hinf I (Zhou *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008).

Cuadro 2. Métodos de diagnóstico utilizadas para la detección del CTV.

Técnica de detección CTV	Fuente
SSCP del gen de la capa proteica	Rivas-Valencia, 2008.
PCR anidado en planta	Olmos <i>et al.</i> (1999).
PCR y PCR por inmunopresión	Nolasco <i>et al.</i> (1993).
RT-PCR con iniciadores específicos de genotipos de CTV	Hilf <i>et al.</i> (2005).
SSCP de diferentes regiones de RNA genómico	Sambade <i>et al.</i> (2007).
RFLP con producto de RT-PCR del gen de la capa proteica utilizando enzimas de restricción Hinf I	Zhou <i>et al.</i> (2007). Jiang <i>et al.</i> (2008).
PCR tiempo real en planta	Saponari <i>et al.</i> (2008).

La detección de CTV en el vector se ha estudiado mediante pruebas serológicas y moleculares (Cuadro 3). Tal es el caso de la prueba serológica ELISA (EPPO, 2004), RT-PCR y PCR (Metha *et al.*, 1997; Cambra *et al.*, 2006; Loeza-Kuk *et al.*, 2008), PCR anidado (Olmos *et al.*, 1999), qRT-PCR y qPCR (Fabre, 2003; Saponari *et al.* 2008) y PCR multiplex en tiempo real (Ananthakrishnan *et al.*, 2010).

La caracterización de aislamientos de CTV es de suma importancia para el control de la enfermedad, sobre todo como herramienta para el manejo adecuado en regiones donde se identifique aislamientos de tipo severo, principalmente en etapas

tempranas de la epidemia. Sin embargo, la presencia de poblaciones con aislamientos congregados en el mismo hospedante aumenta la dificultad en este proceso. De acuerdo con Rubio y colaboradores (2001), y Brlansky y colaboradores (2003), en la naturaleza existen poblaciones de aislamientos de CTV, este conjunto puede estar conformado por haplotipos y por aislamientos severos y moderados con efectos de competencia y supresión de su expresión patogénica. Esto se favorece por el carácter perenne del hospedante. Es necesario diferenciar entre un haplotipo que representa una subpoblación con un perfil electroforético diferencial, pero no necesariamente con características biológicas y patogénicas diferenciales.

Cuadro 3. Pruebas de detección de CTV en áfidos (Hemíptera). Se mencionan distintas técnicas para la detección de la partícula viral en vector.

Técnica	Fuente
ELISA	EPPO, 2004.
RT-PCR	Metha <i>et al.</i> , 1997.
PCR	Cambra <i>et al.</i> , 2006.
RT-PCR anido	Loeza-Kuk <i>et al.</i> , 2008
RT-PCR tiempo real	Fabre, 2003.
PCR tiempo real en áfido	Saponari <i>et al.</i> (2008).
PCR multiplex en tiempo real	Ananthkrishnan <i>et al.</i> , 2010.

RELACIÓN VIRUS-PLANTA-VECTOR

El vector

En el cultivo de los cítricos es común encontrar afidofauna compuesta por varias especies compartiendo la superficie y los recursos, sin embargo, las especies con más reportes en algunas zonas citrícolas son: *Aphis craccivora* Koch, *Aphis gossypii* Clover, *A. spiraecola* Patch, *Toxoptera aurantii* (Boyer de Fonscolombe) y *T. citricida* Kirkaldy (Halbert and Brown, 1996). Esta último es considerada una de las especies que más afecta a los cítricos, directamente causa daños en la zona de alimentación, produce grandes cantidades de mielecilla que al acumularse en la hoja favorece el desarrollo de hongos causantes de fumagina, disminuyendo la actividad fotosintética, causa enrollamiento de los folíolos y distorsión de brotes inmaduros de donde se alimenta (SINAVEF, 2012); sin embargo, adquiere mayor importancia por ser el vector más eficiente del CTV, en el continente Americano el CTV fue el responsable de la muerte de más de 40 millones de cítricos solamente en países como Brasil, Argentina y Venezuela (Rocha-Peña *et al.*, 1995). *T. citricida* sobresale de otros vectores, ya que es capaz de transmitir la partícula viral de 6 a 25 veces más que el áfido *A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1994).

T. citricida es considerada una especie monófaga de plantas de la familia Rutaceae, aunque autores como Holman (1974), Michaud, (1998) y Blackman y Eastop (2000) difieren, ellos indican que es posible encontrar a esta especie en baja frecuencia en otras familias botánicas. El ciclo de vida de *T. citricida* es principalmente anholocíclico, aunque en Japón se detectó su forma sexual (Michaud, 1998). La duración de su ciclo vital está determinado por las condiciones ambientales donde se desarrolla, en escenarios ideales, su período de desarrollo es de 6 a 8 días, presentan cuatro estadios ninfales y la capacidad de una hembra en promedio es dar origen a 20 ninfas en un lapso de cuatro a cinco días. Por lo general coloniza brotes inmaduros, cuando este madura y su consistencia ya no es ideal para la alimentación se inicia la formación de áfidos alados que migran en búsqueda de brotes inmaduros y forman nuevas colonias. Komazaki (1982) menciona que la temperatura óptima de desarrollo de *T. citricida* es de 20°C, ideal para potenciar su capacidad reproductiva y longevidad.

La identificación de *T. citricida* puede resultar complicada ya que otras especies que comparten su nicho presentan características similares, como coloración oscura y simultáneamente pueden estar colonizando dos o más especies el mismo brote; sin embargo, *T. citricida* es de mayor tamaño y los adultos ápteros muestran un color oscuro brillante en comparación con otras especies. Los ejemplares alados de *T. citricida* presentan una pigmentación en los tres primeros artejos y del cuarto al sexto son pálidos. Los sífinculos y la cauda son alargados y de color negro. La cauda es redondeada con 26 a 38 setas. Ambas alas anteriores presentan una venación media dos veces dividida y el pterostigma es pálido oscuro (Halbert y Brown, 1996 y SINAVEF, 2012).

De acuerdo al CABI (2013), *T. citricida* se encuentra distribuido en los cinco continentes y el primer registro en el continente americano se remonta al año de 1991 en Costa Rica (Voegtlin y Villalobos, 1992). En México, Villegas (2003) reporta la presencia de 11 especies de áfidos en zonas citrícolas y *T. citricida* aparece en dos familias botánicas: Rutaceae y Anonaceae, la población de esta especie está conformada solamente por hembras partenogenéticas.

La población está controlada por agentes bióticos y abióticos, dentro de estos últimos podemos mencionar que a nivel mundial se han identificado al menos 113 especies de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y entomopatógenos) que atacan al pulgón. En México estaban presentes al menos 18 de ellos (Michaud, 1998 y López Arroyo *et al.*, 2008).

Actualmente en México se reporta a *T. citricida* en entidades citrícolas (fig. 5), desde su primera detección en el año 2000 en la Península de Yucatán (Michaud y Álvarez, 2000) se ha dispersado a los estados de Tabasco, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Querétaro, Nayarit, Jalisco y San Luis Potosí (SENASICA, 2012).

Hasta el momento no han sido tan severos los daños en árboles en zonas donde hay coincidencia de CTV y *T. citricida*, como los reportados en otros países (Rocha-Peña, 1995), ya que los cítricos infectados suelen permanecer asintomáticos y no

manifiestan declinamiento repentino. Brlansky y colaboradores (2003) separaron subaislamientos de tipo moderado y severo de CTV por medio de *T. citricida*, por su parte, Broadbent *et al.* (1996) concluyeron también que *T. citricida* tiene la capacidad de separar subaislamientos de CTV.

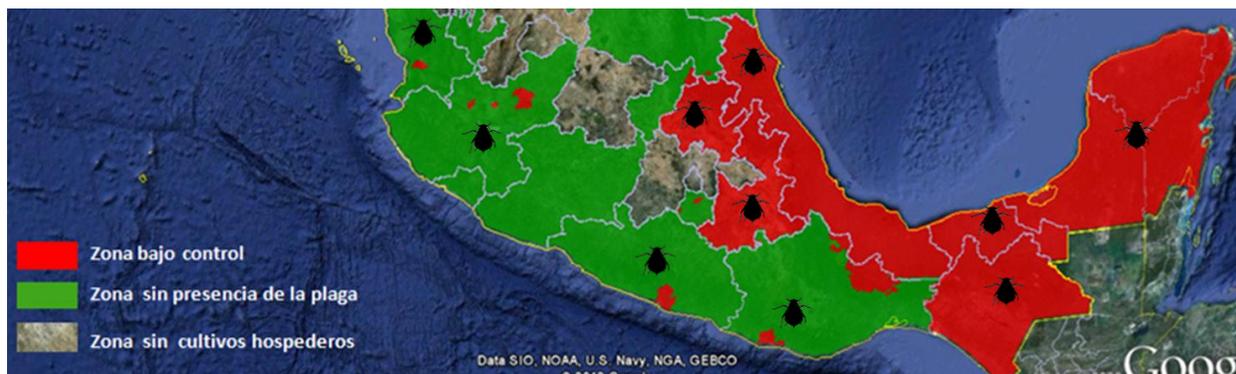


Figura 5. Estados con detección de *T. citricida*. En color rojo se indica zonas con detección del áfido. Fuente: SINAVEF 2012.

La detección de CTV en áfido resulta difícil, probablemente por la baja concentración de este en el insecto, Loeza-Kuk y colaboradores (2008) analizó áfidos de la especie *T. citricida* en Brasil para evaluar la presencia de CTV, con la técnica de RT-PCR ninguna muestra fue positiva al virus, con RT-PCR anidado cero muestras fueron positivas, más con la técnica de SSCP si se detectó la presencia de CTV en áfido.

Debido a su alto potencial reproductivo y ser un organismo partenogenético *T. Citricida* tiene la facultad de desarrollar altas poblaciones en tiempos relativamente cortos, así mismo, las condiciones climáticas en zonas citrícolas de México favorecen la colonización de brotes y su introducción a nuevas áreas es altamente probables. Por lo anterior, el conocimiento de las poblaciones de *T. citricida* en el México permitirá tomar medidas fitosanitarias para controlar al vector más eficiente en la transmisión de CTV.

El virus

Brlansky y colaboradores (2003) indica que en campo, la población de CTV es un conjunto de aislamientos que inducen síntomas moderados y severos. Esto puede atribuirse a efectos combinados de presión de selección, de esta manera pueden generarse genomas funcionales de CTV bajo condiciones específicas. Con lo anterior se demostró que *T. citricida* tiene la capacidad de seleccionar aislamientos. Roy y Brlanski (2009) mencionan que en una población de CTV un genotipo a menudo es el dominante, más la presencia de áfidos puede generar cambios en la estructura poblacional del virus al seleccionar aislamientos y subaislamientos de CTV, y que estos cambios pueden tener consecuencias en la citricultura. Trabajos como el de Herrera-Isidrón y colaboradores (2009) indican que en México las poblaciones de CTV son una mezcla de aislamientos con distintas propiedades biológicas y genéticas.

LITERATURA CITADA

- Albiach-Martí M., C. Robertson, S. Gowda, S. Tatineni, B. Belliure, S. M. Garnsey, S. Y. Folimonova, P. Moreno, and W. O. Dawson. 2010. The pathogenicity determinant of *Citrus tristeza virus* causing the seedling yellows syndrome maps at the 3'-terminal region of the viral genome. *Molecular Plant Pathology* 11: 55-67.
- Ananthakrishna G., T. Venkataprasanna, A. Roy and R. H. Brlansky. 2010. Characterization of the mixture of genotypes of a *Citrus tristeza virus* isolate by reverse transcription quantitative real-time PCR. *Journal of Virological Methods* 164: 75-82.
- Ayllón M. A., L. Rubio, V. Sentandreu, A. Moya, J. Guerri and P. Moreno. 2006. Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes* 32: 119-128.
- Bar-Joseph M., R. Marcus and R. F. Lee. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Physiology* 27: 291-316.

- Blackman R. L., and V. F. Eastop. 2000. Aphids on the world's crops. An identification and information guide. John Wiley & Sons. Avon England. 2a Edition. 466 p.
- 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 sub-isolates by single aphid transmission. *Plant Disease* 80: 329-333.
- Cambra M., M. R. Gorris, C. Marroquin, 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.
- Cambra M., E. Bertolini, A. Olmos and N. Capote. 2006. Molecular methods for detection and quantitation of virus in aphids. In: Cooper I, T. Kuhne, V. Polischuk, (ed), *Virus diseases and Crop Biosecurity*. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 81-88.
- 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 México. *Plant Disease* 81: 693.
- Cheng X., X. Wu, H. Wang, Y. Sun, Y. Qian, and L. Luo. 2012. High codon adaptation in *Citrus tristeza virus* to its citrus host. *Virology Journal* 9: 113.
- EPPO. 2006. *Citrus tristeza closterovirus*. Distribution maps of quarantine pests for Europe. Data sheet on quarantine pests of Europe.
- Fabre F., C. Kervarrec, L. Miezuet, G. Riault, A. Vialatte and E. Jacquot. 2003. Improvement of *Barley yellow dwarf virus*-PAV detection in single aphids using a fluorescent real time RT-PCR. *Journal of Virology Methods* 110: 51-60.

- Fundación Produce Sinaloa A.C. 2009. Memoria III Jornada de transferencia de tecnología de cítricos. SAGARPA. Gobierno del estado de Sinaloa. <http://www.fps.org.mx/divulgacion/attachments/article/819/III%20Jornada%20de%20transferencia%20de%20tecnologia%20citricos.pdf>.
- Ghorbel R., C. López, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores and L. Peña. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27-36.
- Gottwald T. R., G. J. Gibson, S. M. Garnsey and M. Irey. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by stochastic modeling. *Phytopathology* 89: 603-608.
- Gowda S, S. Tatineni, C.L. Davis, J. Navas-Castillo, and M. R. Albiach-Marti. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274: 246–254.
- Halbert S. E., and L. G. Brown. 1996. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), brown citrus aphid identification, biology and management strategies. Florida Department of Agriculture & Consumer Services Division of Plant Industry, Entomology 6 p.
- Herrera-Isidrón L., Ochoa-Sánchez, J.C., Rivera-Bustamante, R., Martínez-Soriano, J.P. 2009. Sequence diversity on four ORFs of *Citrus tristeza virus* correlates with pathogenicity. *Virology Journal* 6:116.
- Hilf M., V. A. Mavrodieva and S. M. Garnsey. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95: 909-917.
- Holman J. 1974. Los áfidos de Cuba. Ed. Organismos. Instituto Cubano del Libro. La Habana, Cuba. 304 p.

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Salcedo-Baca D., R. A. Hinojosa, G. Mora-Aguilera, I. Covarrubias-Gutiérrez, F. J. R. DePaolis, J. S. Mora-Flores, C. L. Cintora. 2010. Evaluación del impacto económico del Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola Mexicana. SAGARPA. <http://www.iica.int/Esp/regiones/norte/mexico/Publicaciones%20de%20la%20Oficina/B2009e.pdf>.
- Jiang B., N. Hong and G. P. Wang. 2008. Characterization of *Citrus tristeza virus* strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. *Virus Genes* 37: 185-92.
- 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.
- Khatchikian D, M. Orlich, and R. Rott. 1989. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28S ribosomal RNA sequence into the hemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 340: 156–157.
- Komazaki S. 1982. Effects of constant temperatures on population growth of three aphid species, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola* van der Goot and *Aphis gossypii* Glover (Homóptera: Aphididae) on citrus. *Applied Entomology and Zoology* 17: 75-81.
- Loeza-Kuk E., D. L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, M. A. Gutiérrez-Espinosa, W. Cintra de Jesús Junior, A. Villegas-Monter, N. Arno-Wulff, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2008. Detection of *Citrus sudden death-associated virus* and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. *Agrociencia* 42: 669-678.
- Loeza-Kuk, E. 2008. Características epidemiológicas y moleculares de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 103 p.

- López 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* 269: 462-470.
- López-Arroyo J. I., J. Loera-Gallardo, M. A. Rocha-Peña, R. Canales. I. Hernández, M. A. Reyes, A. Berlanga, y M. A. Miranda. 2008. Pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae), pp. 279-292. *In*: H. C. Arredondo y L. A. Rodríguez (eds.), *Casos de control biológico en México*. Mundi-Prensa. México, D.F.
- Lovisolo, O., R. Hull, and O. Rosler. 2003. Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. *Advances in Virus Research* 62: 325–379.
- Lu R., A. Folimonov, M. Shintaku, W. X. Li, B. W. Falk, W. O. Dawson, and S. W. Ding. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 15742-15747.
- Mehta P., R. H. Brlansky, S. Gowda and R. K. Yokomi. 1997. Reverse transcription polymerase chain reaction detection of *Citrus tristeza virus* in aphids. *Plant Disease* 81: 1066-1069.
- Michaud J. P. 1998. A review of literature on *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). *Florida Entomologist* 81: 37- 61.
- Michaud J. P., and R. Álvarez. 2000. First collection of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, Mexico. *Florida Entomologist* 83: 357-358.
- Müller G. W., M. L. Targon, and M. A. Machado. 2000. Thirty years of preimmunized pera sweet orange in the citricultura in São Paulo State, Brazil. *In*: *Proceedings of the 14th Conference of IOCV*. Riverside, CA. pp: 400-403.
- Nolasco G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45: 201-218.

- Olmos A., M. Cambra, O. Esteban, M. T. Gorris and E. Terrada. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube Nucleic Acids Research 27: 1564-1565.
- Rivas-Valencia P. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. 131 pp.
- Rivas-Valencia P., E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, N. Ruiz-García, D. L. Ochoa-Martínez, A. Gutiérrez-Espinoza, y V. Febres. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* en Yucatán y Tamaulipas. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 1:493-507.
- 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*. Plant Disease 79: 437-445.
- Roy A., and R. H. Brlansky. 2004. Genotype classification and molecular evidence for the presence of mixed infections in Indian *Citrus tristeza virus* isolates. Archives of Virology 149: 1911-1929.
- Roy A., and R. H. Brlansky. 2009. Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: Identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. Phytopathology 99: 1297-1306.
- Rubio L., M. A. Ayllón, J. Guerri, H. Pappu, C. L. Niblett and P. Moreno. 1996. Differentiation of *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) isolates by single-strands conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. Annal of Applied Biology 129: 479-489.
- Rubio L., M. A. Ayllón, P. Kong, A. Fernández, M. Polek, J. Guerri, P. Moreno, and B. W. Falk. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infection and recombination. Journal of Virology 75: 8054-8062.
- Sambade A., S. Ambrós, C. López, S. Ruiz-Ruiz, A. Hermoso de Mendoza, R. Flores, J. Guerri and P. Moreno. 2007. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants inoculated with mild and severe variants. Archive of Virology 152: 1115-1126.

- Saponari M., K. Manjunath and R. K. Yokomi. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods* 147: 43-53.
- SENASICA. 2012. Estatus fitosanitario para pulgón café de los cítricos (PCC) en México. SAGARPA, SENASICA. Consultado en línea el 26 de septiembre de 2012 en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=1010>.
- SINAVEF. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 2012. Ficha técnica pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldi). Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, D.F. 24 p.
- Stenger D. C., D. L. Seifers, and R. French. 2002. Patterns of polymorphism in Wheat streak mosaic virus: Sequence space explored by a clade of closely related viral genotypes rivals that between the most divergent strains. *Virology* 302: 58–70.
- Sztuba-Solinska J., A. Urbanowicz, M. Figlerowicz, and J. Bujarski. 2011. RNA-RNA Recombination in Plant Virus Replication and Evolution. *Annual Review of Phytopathology* 49: 415-443.
- Tatineni S., S. Gowda, V. P. Boyko, M. R. Albiach-Marti, and M. Mawassi. 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 7433–7438.
- Tatineni S., S. Gowda, M. A. Ayllón, M. R. Albiach-Martí, R. Rabindram, and W. O. Dawson. 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76: 473-483.
- Tatineni S., C. Robertson, S. M. Garnsey, M. Bar-Joseph, S. Gowda, and W. O. Dawson. 2008. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus. *Virology* 376: 297-307.
- Tatineni S., C. J. Robertson, S. M. Garnsey, and W. O. Dawson. 2011. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108: 17366-17371.
- Tsai J. H., Y. H. Liu, J. J. Wang and R. F. Lee. 2000. Recovery of orange stem-pitting strains of *Citrus tristeza virus* following single aphid transmissions with *Toxoptera citricida* from a Florida decline isolate of CTV. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 113: 75-78.
- Villegas J. N. 2003 Biología y morfometría de las principales especies de áfidos (Homóptera: Aphidoidea) vectores de virus en México. Tesis de Maestría ENCB-IPN. México. 203 p.
- Vives M. C., L. Rubio, A. Sambade, 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.
- Voegtlin D., and W. Villalobos. 1992. Confirmation of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricidus*, in Costa Rica. Florida Entomologist 75: 161-162.
- Yokomi R. K., R. Lastra, M. B. Stoetzel, 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 in Central America and the Caribbean Basin and transmission of the *Citrus tristeza virus*. Journal of Economical Entomology 87: 1078-1085.
- Zhou Y., C. Y. Zhou, Z. Song, K. H. Liu and F. Y. Yang. 2007. Characterization of *Citrus tristeza virus* isolates by indicators and molecular biology methods. Agricultural Sciences in China 6: 573-579.

III. PREVALENCIA DE *TOXOPTERA CITRICIDA* Y TASA DE ADQUISICIÓN DEL *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EN LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

Gabriel Alejandro Hernández-Nava¹, Gustavo Mora-Aguilera¹, María Alejandra Gutiérrez-Espinosa¹, Emiliano Loeza-Kuk², Iobana Alanís-Martínez³, Sarah Alejandra Patiño-Arellano¹.

RESUMEN

La progresiva dispersión de *Toxoptera citricida* (Tc) en la Península de Yucatán (PY) y otras entidades productoras de cítricos justifica el estudio éste áfido para determinar frecuencia de individuos virulíferos al *Citrus tristeza virus* (CTV) y establecer el tipo de aislamiento que dispersa con el fin de prevenir epidemias potenciales. Durante febrero 2011 y enero 2012 se censaron en PY cinco huertos con antecedentes positivos al CTV. Se realizaron muestreos en huertos con antecedentes históricos positivos al CTV durante noviembre 2011 a marzo 2013 en 18 huertos. En 2.5 años Tc se detectó en un rango de infestación del 6%(1/17)-35%(6/17), siendo mayor en invierno 2012. La colonización de Tc fue frecuente en limón persa (*C. latifolia*) con 72%(65/90), en comparación con 28%(25/90) de naranja Valencia (*C. sinensis*). La mayor colonización de Tc ocurrió en Yucatán y Campeche en brotes orientados al este-dosel con 44%(11/25) y 35%(23/65), respectivamente. El porcentaje de muestras Tc positivas tuvo un rango de 0%-75%, predominando en febrero y marzo 2012 con 75%(9/12 y 6/8, respectivamente). En total, de 1500 individuos colectados se estimaron 223 áfidos virulíferos (14.8%). El porcentaje de brotes positivos fue 57%(51/90). Hubo baja coincidencia de la condición positiva al CTV en la relación Tc-brote. En Campeche, la

¹Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, edo. de Méx., CP 56230, México; ²INIFAP CIRSE-Mocochá. Km 25.5 Antigua Carretera Mérida–Motul, C.P. 97454. Mocochá, Yucatán. ³ENECUSAV-DGSV-SENASICA. Rancho GB. S/N.

coincidencia no rebasó el 38%(3/8), mientras que en Yucatán no superó el 33%(1/3). Se secuenciaron cuatro muestras de áfidos positivos por PCR anidado los cuales fueron similares al aislamiento severo y moderado tipo T36(2/4) y T30(2/4), respectivamente. En diecisiete muestras de brotes positivos por PCR anidado prevaleció el aislamiento moderado tipo T30 (17/17). Esto confirma la baja prevalencia y virulificidad de Tc en PY, así como la prevalencia de un aislado de tipo moderado.

Palabras clave adicionales: CTV, *Toxoptera citricida*, *Citrus* sp.

ABSTRACT

Detection in 2000 of *Toxoptera citricida* (Tc) in the Yucatan Peninsula (PY) and its gradual spread in the country justifies this study the prevalence of vector in citrus orchards of PY; determine the frequency of viruliferous individuals to *Citrus tristeza virus* (CTV) and set the type of insulation that disperses in order to prevent potential epidemics. During February 2011 and January 2012 were counted in five orchards with a history PY positive CTV. November 2011-March 2013 were conducted in 18 orchards six samplings aimed at positive foci. By tree, 1-4 samples were collected independently of wingless aphids (10 insects / sample) and its bud colonized. In 2.5 years Tc was detected in a range of infestation of 6% (1/17) -35% (6/17), being higher in winter 2012. The colonization of Tc was common Persian lime (*C. latifolia*) with 72% (65/90), compared with 28% (25/90) Valencia orange (*C. sinensis*). Higher colonization of Tc occurred in Yucatan and Campeche in buds oriented east-canopy with 44% (11/25) and 35% (23/65), respectively. The percentage of samples positive Tc ranged from 0% - 75%, predominantly in February and March 2012 with 75% (9/12 and 6/8, respectively). A total of 1500 individuals collected viruliferous aphids were estimated 223 (14.8%). The percentage of positive shoots was 57% (51/90). There was low coincidence of CTV-positive status in the relationship Tc-bud. In Campeche, the match did not exceed 38% (3/8), while in Yucatan did not exceed 33% (1/3). Four samples were sequenced by nested PCR positive aphids which were similar to the isolation severe and moderate type T36 (2/4) and T30 (2/4), respectively. In seventeen samples positive by nested

PCR bud prevailed T30 tempered type insulation (17/17). This confirms the low prevalence and PY virulificidad of Tc, and the prevalence of a moderate type isolate.

Additional keywords: CTV, *Toxoptera citricida*, *Citrus* sp.

3.1. INTRODUCCIÓN

México es considerado uno de los principales productores de cítricos, informes del IICA (2010) indican que 69 mil productores dependen de esta actividad y genera 154 mil empleos directos. En la actualidad, la cadena citrícola mexicana enfrenta un alto riesgo fitosanitario por varias plagas, destacando el HLB; en este contexto el *Citrus tristeza virus* (CTV) fue una de las primeras amenazas en la producción de cítricos, reportándose en México en 1986 (Cepeda-Nieto y Barrera-Saldana, 1997). La ocurrencia de CTV muestra una aparente baja incidencia, con predominancia de aislamientos de tipo moderado, Loeza-Kuk, (2008) y Rivas-Valencia *et al.* (2010) demostraron cambios en frecuencias de haplotipos en planta con indicios de dispersión en condiciones de campo, conjuntamente, la detección de *Toxoptera citricida* Kirkaldy y su continua dispersión en el país sugiere conocer la prevalencia de esta vector en huertos citrícolas, así como determinar frecuencia de adquisición del CTV y establecer que aislamientos esta dispersando, bajo la hipótesis de adquisición y dispersión de aislamientos de tipo severo que generen epidemias intensas.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de huertos

Con el fin de detectar e identificar aislamientos de *Citrus tristeza virus* (CTV) en *T. citricida*, en una primera fase se realizaron muestreos durante 2011 en huertos con antecedentes de árboles positivos: Castamay, ubicado en el municipio de Castamay, Campeche; Esperanza-4, ubicado en el municipio de Dzan, Yucatán y Subteniente López ubicado en el municipio de Othón, Quintana Roo. Posteriormente, una segunda

colecta se efectuó en las huertas de Yucatán Unión-2 y Esperanza-4, en Campeche en las huertas: Castamay y Cayal. Estos huertos se verificaron por presencia de árboles positivos, previo al experimento. La detección de CTV en dichas huertas se realizó por Inmunoimpresión-ELISA (Domínguez-Monge, 2012).

En una segunda fase durante 2012 y 2013 se realizaron muestreos para detectar el virus en *T. citricida* y en los sitios de colonización del insecto en planta. Se amplió el muestreo en la Península de Yucatán en un mayor número de huertas con antecedentes de árboles positivos. La edad de los huertos osciló de 10 a 30 años y correspondieron a naranja (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*), limón (*C. latifolia*) y toronja (*C. paradisi*). Únicamente el huerto Castamay está establecido en un portainjerto tolerante a CTV, el resto está establecido sobre naranjo agrio susceptible al virus (Cuadro 1).

Los huertos se ubicaron en el estado de Yucatán en las localidades de Dzan, Kinchil, Muna, Oxcutzcab, Samahil y Ticul. En Campeche, los municipios de Campeche, Castamay y Champotón. En Quintana Roo, en la localidad de Othón (Fig. 1).

Cuadro 1. Localización y topología de huertos de cítricos para muestreos de *T. citricida* en la Península de Yucatán, México.

Estado	Municipio	Huerta	Coordenadas		Injerto/ Portainjerto	Edad	Árboles Positivos/Árboles totales
			Latitud	Longitud			
Yucatán	Dzan	Esperanza-4	20.3982	-89.4839	Valencia/Agrio	30	70/337
	Dzan	D1	20.3621	-89.4404	Valencia/Agrio	15	2/408
	Kinchil	K1	20.8961	-89.9849	Valencia/Agrio	25	3/301
	Kinchil	K2	20.9034	-89.9957	Valencia/Agrio	25	3/1190
	Muna	M1	20.4763	-89.6939	Valencia/Agrio	10	1/556
	Muna	M2	20.4717	-89.6850	Valencia/Agrio	30	1/469
	Samahil	S1	20.8857	-89.8632	Valencia/Agrio	26	1/278
	Samahil	S2	20.8448	-89.8928	Valencia/Agrio	25	1/714
	Ticul	T1	20.3359	-89.4423	Valencia/Agrio	20	1/536
	Ticul	T2	20.3353	-89.4356	Valencia/Agrio	20	3/278
	Ticul	Unión-2	20.3406	-89.4392	Valencia/Agrio	30	1/816
Campeche	Castamay	Castamay	19.8085	-90.4350	Limón P/Cleopatra	10	6/127
	Campeche	C1	19.7421	-90.1729	Limón P/Agrio	10	1/370
	Campeche	Cayal	19.7431	-90.1734	Valencia/Agrio	20	27/278
	Campeche	C3	20.2695	-90.0809	Valencia/Agrio	20	10/175
	Campeche	C4	19.8141	-90.4289	Valencia/Agrio	20	6/278
	Chamotón	CH1	19.4978	-90.6887	Valencia/Agrio	22	36/317
Quintana Roo	Othón	SL1	18.5166	-88.3780	Valencia/Agrio	15	24/400

Fuente: Domínguez-Monge, 2011. Valencia=C. *sinensis* var. *valencia*, Limón P= *C. latifolia*, Cleopatra=*C. reshni*.

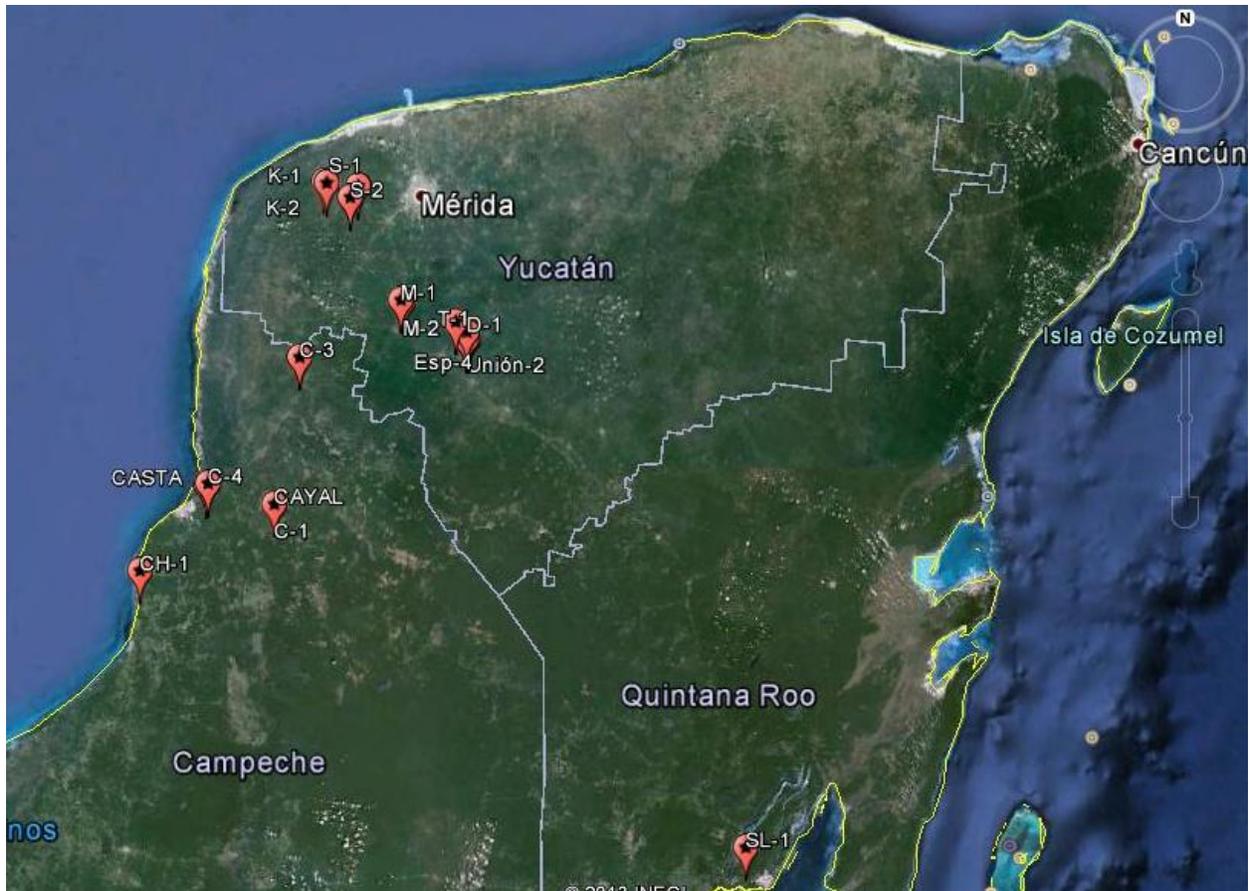


Figura 1. Ubicación espacial de las huertas seleccionadas para detección e identificación de aislamientos CTV.

Colecta de muestras

Muestras de *T. citricida* se colectaron en huertos cítricos de Castamay, Esperanza-4 y Subteniente López. Esta colecta la coordinó Sarah Patiño Arellano, participante del GIIC (Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos) en el área de epidemiología. La colecta se realizó mediante censos. Esto implicó la revisión directa de todas las plantas con el objetivo de detectar infestación de *T. citricida* en brotes de cítricos. Posteriormente, una segunda colecta se efectuó en las huertas de Yucatán Unión-2 y Esperanza-4, en Campeche en las huertas: Castamay y Cayal.

En una segunda fase, se colectaron muestras planta-vector durante la época de brotación en los meses de diciembre a marzo de 2011 al 2013. Para la detección de CTV se realizaron muestreos sincrónicos planta-vector en huertos de cítricos de la Península de Yucatán. Para esto se realizaron muestreos dirigidos a árboles (*Citrus* spp) en fase de brotación, previamente detectados positivos mediante inmunopresión-Elisa (Domínguez-Monge, 2012). Se priorizó huertos con antecedentes de alta incidencia de CTV. En ausencia de áfidos colonizando árboles positivos, se muestreó árboles vecinos infestados con *T. citricida*. Para la colecta se revisó el dosel del árbol en busca de brotes colonizados por *T. citricida* y con daños por alimentación. Se colectaron brotes de aproximadamente 10 cm, separando áfidos adultos ápteros del tejido vegetal con ayuda de un pincel. Los áfidos colectados constituyeron una muestra por brote (Fig. 2). Los áfidos se depositaron en frascos de plástico (2x4 cm) con alcohol al 70%. Posteriormente, el frasco se etiquetó con los siguientes datos: fecha, número de muestra y localidad (Apéndice 1).

Complementariamente, cada brote de donde se colectaron los áfidos se colocaron independientemente en bolsas de plástico y se etiquetaron con los datos descritos previamente.

Conservación de las muestras

Las muestras de áfidos y de tejido vegetal se mantuvieron bajo resguardo del sol y a baja temperatura, transportándose en hielera con el fin de mantener la muestra en condiciones óptimas para estudios moleculares. En laboratorio se cambió el alcohol de las muestras de áfidos manteniendo la misma concentración. Los brotes se lavaron con detergente y se separaron las hojas del tallo. Posteriormente, se separó la nervadura central de las hojas y la corteza del tallo y se colocaron en sanitas dentro de bolsa de plástico etiquetada. Las muestras de tejido vegetal se fragmentaron en segmentos pequeños y se colocaron a -20 °C para su conservación y posterior procesamiento.

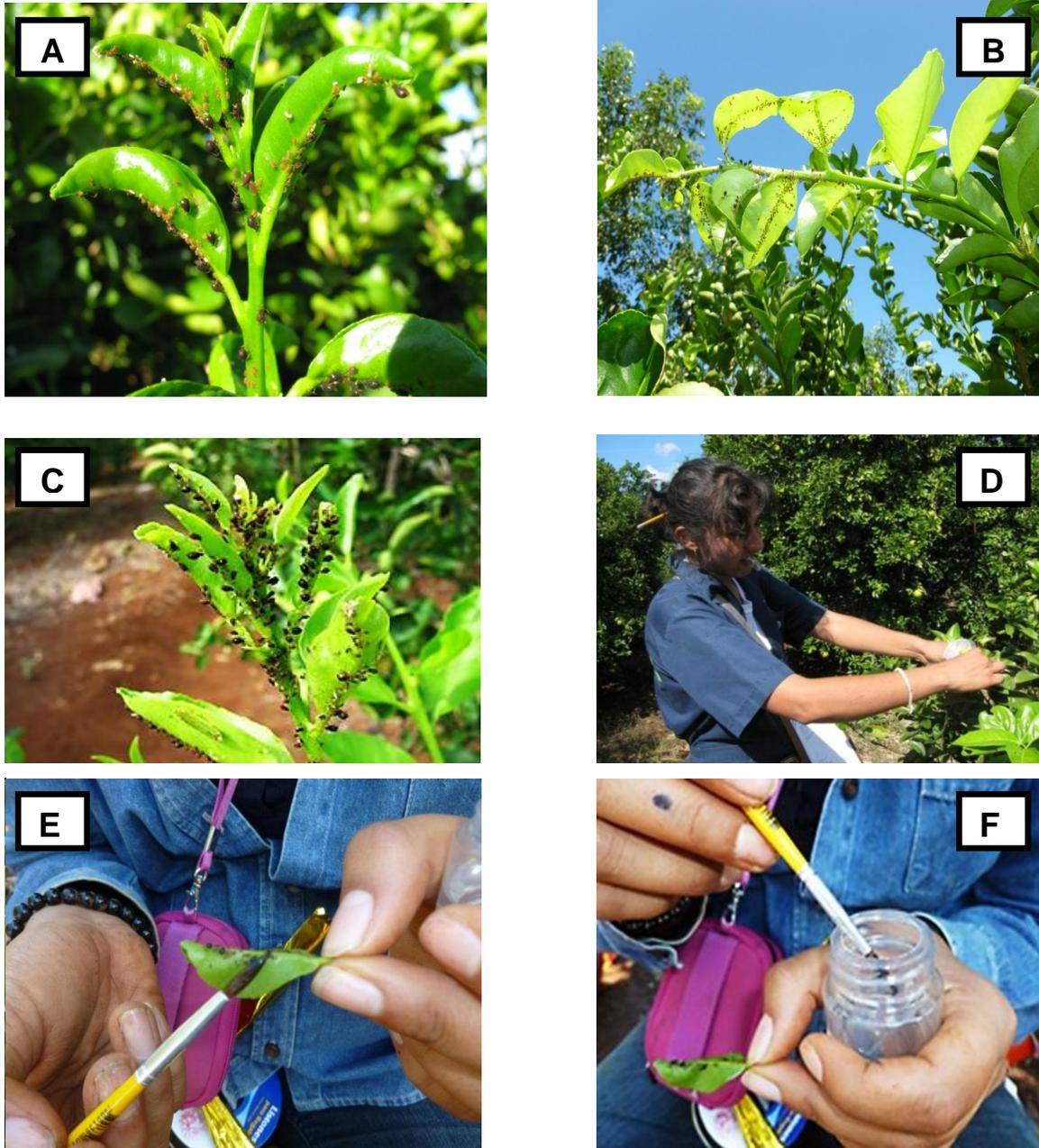


Figura 2. Aspecto de brote de cítrico colonizado por áfidos y colecta manual de brote. Notar en A, B y C que los brotes presentan daños por alimentación consistente del áfido como enrollamiento, acortamiento de entrenudos y clorosis; así mismo la predominancia del insecto por el envés de las hojas asociado a nervadura central. En D, E y F se muestra la escisión del brote colonizado, posteriormente la separación de muestras de áfidos del tejido vegetal en campo y la deposición de áfidos en frascos con alcohol al 70%.

Identificación de áfidos

La identificación de especies de áfidos se realizó en el laboratorio de entomología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo por Sarah Alejandra Patiño Arellano. Se realizó por medio de observación directa, con microscopio estereoscópico, siguiendo las claves de Stoetzel (1994), Halbert y Brown (1996) y Villegas (2003) (Fig. 3). La confirmación de la identidad taxonómica se realizó con el apoyo de Rebeca Peña Martínez, especialista nacional en áfidos.

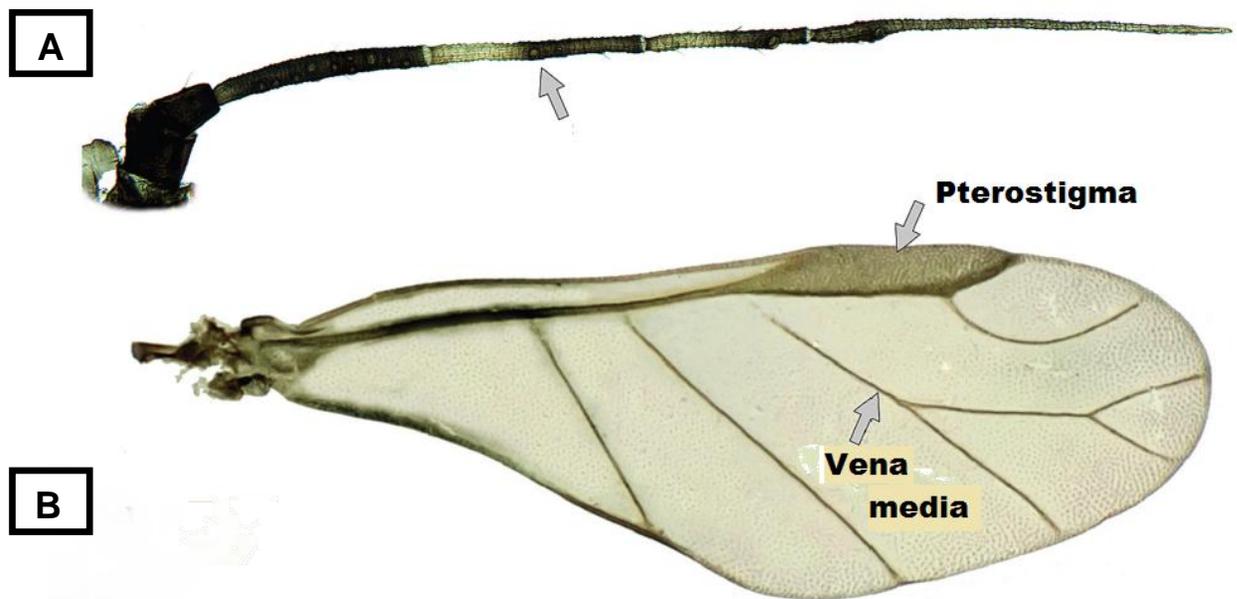


Figura 3. Identificación de *Toxoptera citricida*. Apreciar en A el patrón de pigmentación en antenas y en B detalle de ala anterior. Fuente: Ficha Técnica Pulgón café de los Citricos. SINAVEF. 2012.

Detección de CTV en planta y vector

Con el fin de asociar el aislamiento presente en la planta con el adquirido por el vector se realizaron pruebas moleculares con base en PCR. Se emplearon áfidos adultos no alados, que son los de mayor tamaño en la colonia y los que se han alimentado por más tiempo del árbol, por tanto con mayor probabilidad de adquisición de la partícula viral. Se excluyeron áfidos alados en las pruebas para descartar la

posibilidad de obtener aislamientos externos a la planta infestada. A partir del brote donde procedían los áfidos se utilizó la nervadura central de las hojas y la corteza del tallo para la extracción de RNA total. La detección del virus en áfidos, se realizó con PCR anidada y PCR tiempo real. En tejido vegetal se realizó PCR punto final y PCR anidado.

Extracción RNA total en áfidos

En el Colegio de Postgraduados se realizó la extracción de RNA total en muestras de áfidos mediante protocolo modificado por Freitas-Astúa (2003) (Apéndice 2). Cada muestra consistió de 10 insectos adultos ápteros a los cuales se dejó evaporar el alcohol de preservación. Se depositaron los áfidos en un tubo tipo eppendorf y se agregó nitrógeno líquido. Se añadió 25 µL de CTAB 2% (NaCl 1.4 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0) y se trituró la muestra con un pistilo estéril (Fig. 4). Posteriormente se agregó 25 µL de B-Mercaptoetanol (0.5% preparado con agua libre de RNAsas), se mezcló el contenido del tubo en vortex y se incubó por 15 minutos a 55 °C. Consecutivamente se adicionó 150 µL de Cloroformo:Alcoholisoamílico en una proporción 24:1, se mezcló en vortex y se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Al terminar la centrifugación se transfirieron 35 µL de sobrenadante a un tubo nuevo, se repitió la extracción con 100 µL de cloroformo:alcoholisoamílico y la muestra se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió 30 µL del sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 3 µL de acetato de amonio (7.5 M) más 30 µL de isopropanol, se mezcló ligeramente e incubó a temperatura de -20°C por 60 minutos. Posteriormente se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó; se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12000 rpm durante 1 minuto a 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar los residuos de alcohol a temperatura ambiente; se resuspendió la pastilla en 30 µL de agua libre de RNAsas y se almacenó la muestra a -20°C. La calidad y cantidad de ARN obtenido se corroboró en Nanodrop 2000.

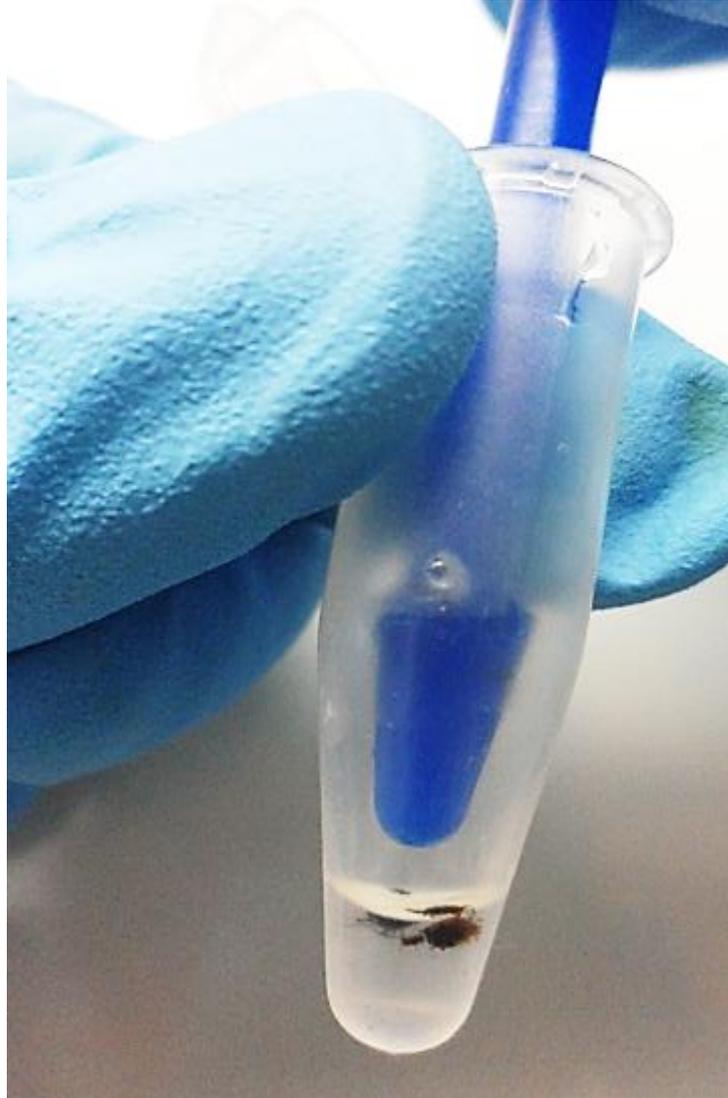


Figura 4. Extracción de RNA total en áfidos utilizando brocas estériles.

Extracción RNA total en tejido vegetal

La extracción de RNA total en muestras de tejido vegetal también se realizó en el Colegio de Postgraduados mediante el protocolo de Harris (2002) (Apéndice 3). En tubo eppendorf se depositó 0.05 gramos de tejido vegetal, manteniendo la muestra a baja temperatura, evitando la degradación del ácido nucleico. Se utilizó un macerador y se agregó 600 μL de buffer salino. La muestra se centrifugó a 14000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. Posteriormente se

agregó 600 μL de CTAB al 2% (NaCl 1.4 M, Tris-HCl 0.1 M pH 8.0) y 3 μL de B-Mercaptoetanol al 100%. Se mezcló el contenido del tubo en vortex por 10 segundos y se incubó a 55°C por 30 minutos. A continuación se agregó 400 μL de Fenol:Cloroformo:Alcoholisoamílico en una proporción 25:24:1 respectivamente, mezclando la muestra en vortex por 10 segundos. Se centrifugó el tubo por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se colectó 500 μL de la fase acuosa en un tubo nuevo en volúmenes de 100 μL evitando que las fases se mezclen. Posteriormente se agregó 50 μL de acetato de amonio y 500 μL de isopropanol y se incubó la muestra por 10 minutos a temperatura de -20 °C. A continuación se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó el tubo eppendorf por 1 minuto a 14000 rpm a 4°C. Terminado este tiempo, se secó la muestra a temperatura ambiente hasta la evaporación del etanol. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50 μL de agua libre de RNAasa y se almacenó la muestra a -20°C. La calidad y cantidad de ARN obtenido se corroboró en Nanodrop.

Cuantificación de ARN

Se evaluó la cantidad y pureza del RNA total de muestras vegetales y de áfido por espectrofotometría de micro volúmenes en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). El RNA se cuantificó a través de la lectura de absorbancia de luz ultravioleta (A). Se determinó la concentración de ácidos nucleicos a 260 nm. Para calcular la pureza del RNA total y determinar la presencia de contaminantes se determinó calculando el cociente A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , dado que las proteínas absorben a 280 nm y a 230 nm hidratos de carbono, péptidos, fenoles, compuestos aromáticos u otras sustancias (Rojas *et al.*, 2011).

Se dispuso 1 μL de agua libre de RNAasa como blanco para la calibración del equipo. Se colocó 1 μL de la muestra de RNA total, y se cuantificó en el sensor del NanoDrop. Se generó una base de datos con la información de concentración y pureza de muestras de áfidos y plantas (Apéndice 4 y 5).

Síntesis de cDNA en áfido y planta

Se realizó en un solo paso la retrotranscripción de la partícula viral y la amplificación de la cadena molde a partir de RNA total extraído de áfidos y tejido vegetal, utilizando los iniciadores CPN (Narváez *et al.*, 2000) que flanquean el gen de la proteína p25 del CTV. Para la obtención de cDNA se requirió precalentar 5 µL de ARN en un tubo para PCR y se programó el termociclador a una temperatura de 70 °C por diez minutos para alinear la molécula de ARN. Al concluir este tiempo se enfrió la muestra por 2 o 3 minutos y se adicionó 20 µL de mezcla de reacción que consistió en: 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 100µM de dNTPs, 1 ng de cada iniciador, 10 unidades de RNase OUT, 25 unidades de retrotranscriptasa MMLV y 0.75 unidades de Taq DNA polimerasa. Se programó el termociclador a 42 °C por 60 minutos.

Detección de CTV por PCR en planta

En el Colegio de Postgraduados se realizó la técnica de RT-PCR de un solo paso para detectar *Citrus tristeza virus* en planta. Se amplificó un fragmento del gen p25 que codifica a la capa proteica del virus en el extremo 3' con una longitud de 671 pb. Se realizó la mezcla de reacción que consistió en: 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 100 µM de dNTPs, 1 ng de los iniciadores CPN-F 5' ATTGGCGACGAAACAAAG 3' y CPN-R 5' TCAACGTGTGTTGAATTTCC 3', 10 unidades de RNase OUT, 50 unidades de retrotranscriptasa MMLV, 1.25 unidades de Taq DNA polimerasa y 5 µL de RNA total de planta. El programa de amplificación constó de 35 ciclos de 1 minutos a 94°C, 1 minutos a 55°C y 1 minutos a 72°C seguido de un periodo de extensión de final de 5 minutos a 72°C (Apéndice 6). El producto de la amplificación de PCR en planta se analizó en gel de agarosa a 1%, teñido con bromuro de etidio.

Detección de CTV por PCR anidado en planta

Se realizó PCR anidada para confirmar muestras negativas a CTV en planta debido a la baja concentración de la partícula viral. Se amplificó un fragmento del gen p25 que codifica a la capa proteica del virus con una longitud de 273 pb, utilizando 5 µL de producto de RT-PCR en un volumen final de 25 µL. Se realizó la mezcla de reacción: 20 mM de Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.5 mM de MgCl₂, 10 mM de DTT, 100 µM de dNTPs, 1 ng de los iniciadores específicos CPK-F 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA 3' y CPK-R 5' TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000), y 1.25 unidades de Taq DNA Polymerase. El programa de amplificación constó de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C y 30 segundos a 72 °C, seguido de un periodo de extensión de final de 5 minutos a 72 °C. El producto de la amplificación de PCR anidado en planta se analizó en gel de agarosa a 1%, teñido con bromuro de etidio.

Detección de CTV por PCR anidado en áfido

Se realizó PCR anidada en áfidos debido a la baja concentración de la partícula viral en el vector. Al igual que el PCR anidado en plantas, en muestras de insecto se realizó la misma metodología, utilizando los iniciadores CPK (Apéndice 7). El producto de la amplificación se analizó en gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio.

Detección de CTV por RT-PCR tiempo real (qRT-PCR) en áfido

Se realizó la prueba de detección considerada de mayor sensibilidad, qRT-PCR, debido a la baja concentración de la partícula viral en el vector *T. citricida*. La metodología se realizó de acuerdo a Saponari *et al.* (2008). Esta metodología se realizó en ENECUSAV-DGSV-SENASICA por la Ing. Iobana Alanis.

Estimación de áfidos virulíferos

Se generó un modelo para estimar *T. citricida* virulíferos de muestras positivas al CTV. Se tomó en cuenta la proporción de muestras positivas, el número de insectos procesados y se comparó con el rango mínimo y máximo de posibles áfidos virulíferos. La ecuación propuesta en este trabajo fue la siguiente:

$$\widehat{Afv} = \left(\left(\frac{\#Mu_{pos}}{\#Mu_{Tot}} \right) (\#Ins_{pr}) \right) * \left(\#Mu_{pos} \right)$$

Dónde:

\widehat{Afv} = Áfidos virulíferos estimados

$\#Mu_{pos}$ = Número de muestras positivas

$\#Mu_{Tot}$ = Número de muestras totales

$\#Ins_{pr}$ = Número de insectos procesados

Secuenciación de muestras

Se seleccionaron muestras positivas a CTV de planta y vector para caracterizar por secuenciación aislamientos del virus. El producto de RT-PCR en plantas y PCR anidado en áfidos se envió a secuenciar a la empresa MACROGEN INC (Geumchun-Gu, Seoul, Corea), ahí mismo se realizó la purificación de las muestras. Los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar con los iniciadores CPK-F y CPK-R. Las secuencias de ADN se analizaron con el software Bio Edit Sequence Alignment Editor, versión 7.0 y se obtuvo la cadena consenso. Se comparó la secuencia en la base de datos en el Centro Nacional de Información de Biotecnología, NCBI por sus en inglés, por BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Apéndice 10).

Mapas de detección de CTV

Se generaron mapas de dispersión del CTV con el fin examinar y establecer la conducta de aislamientos presentes en planta-vector (fig. 5). Los mapas se generaron con información de Domínguez-Monge (2008) y con base en árboles positivos a CTV por inmunopresión-ELISA. Se crearon modelos **bidimensionales** para comparar frecuencias de aislamientos espaciales indicando la detección de CTV por técnicas moleculares en planta y *T. citricida* con el fin de analizar la dispersión de aislamientos específicos y analizar la correspondencia del aislamiento en planta-vector.

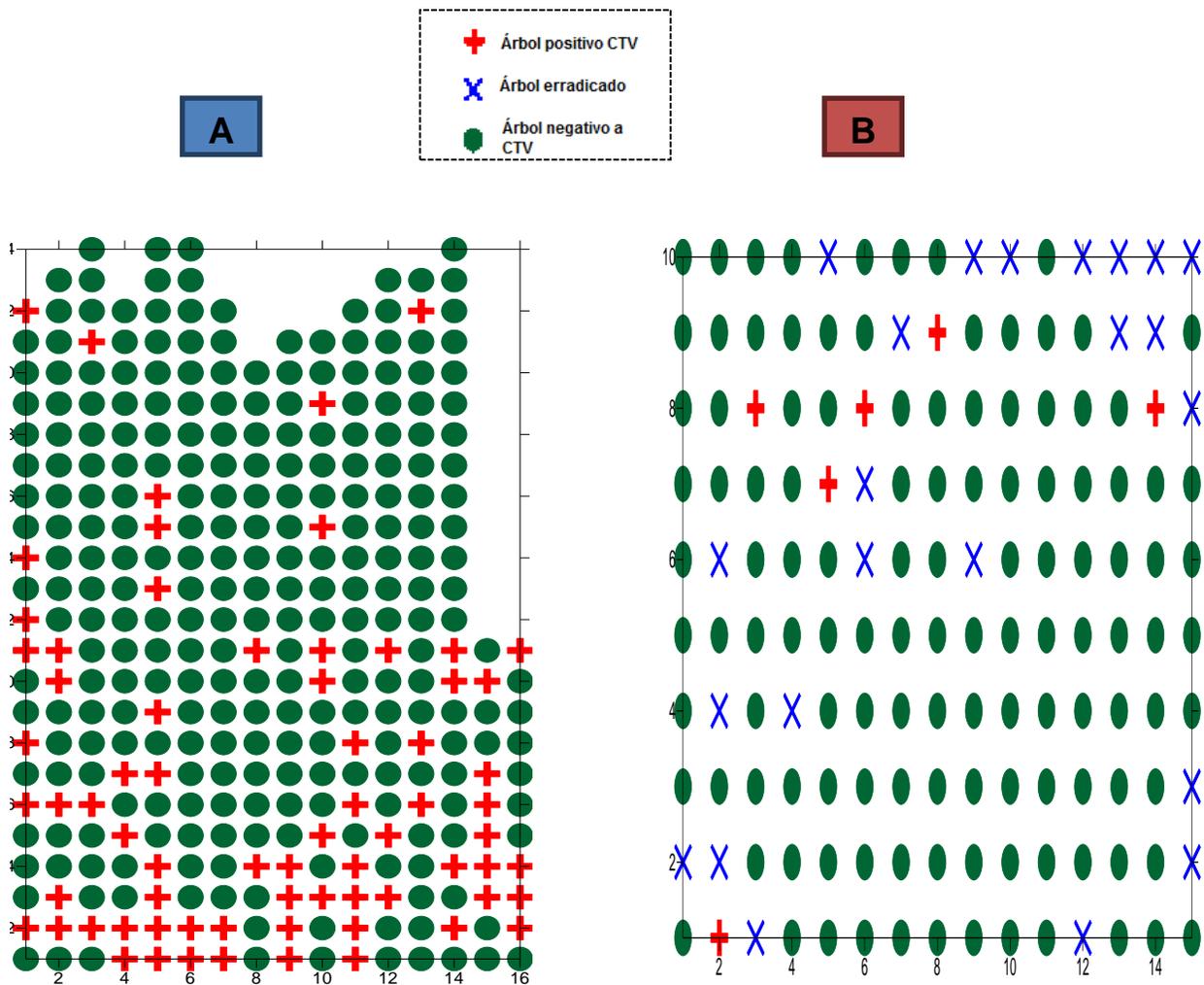


Figura 5. Localización de árboles positivos a CTV (Domínguez-Monge, 2012). A) Ubicación de árboles positivos y negativos a CTV en huerto Esperanza-4, Dzan, Yucatán. B) Ubicación de árboles positivos y negativos a CTV en huerto Castamay, Castamay, Campeche.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infestación regional de *T. citricida* en huertos cítricos

Se detectó a *T. citricida* en huertos cítricos de la Península de Yucatán (PY) en un rango de uno hasta seis huertos de un total de 18 huertos en seis fechas de muestreo de noviembre de 2011 a marzo de 2013 (Fig. 6, Cuadro 2 y 3). El nivel de infestación de *T. citricida* en huertos cítricos durante noviembre de 2011 a marzo del 2013 fue del 6% (1/17) al 35% (6/17). En el 2011 la infestación no superó el 11% y en el 2012 el valor máximo de infestación de *T. citricida* fue del 35%. Hasta la primavera del 2013 la infestación fue del 13%. Aparentemente la mayor infestación de *T. citricida* fue en el periodo de invierno, destacando el muestreo de enero de 2012 con la presencia del vector en 6/17 huertos muestreados. Sin embargo; los niveles de infestación fueron en general bajos. El nivel de infestación por *T. citricida* está relacionado con el estado fenológico de su hospedante y factores ambientales como temperatura y lluvias. Komazaki (1982) menciona que la temperatura óptima de desarrollo de *T. citricida* es de 20°C, ideal para potenciar su capacidad reproductiva y longevidad. Patiño-Arellano (2012) indica que los niveles de infestación de áfidos en la Península de Yucatán no superaron el 18% por fecha de muestreo. Este porcentaje de infestación fue similar al obtenido en este trabajo. La frecuencia de infestación coincidió con los picos de brotación de los cítricos en PY. Patiño-Arellano (2012) menciona que es de enero a marzo.

Cuadro 2. Infestación de *T. citricida* y detección del CTV en muestreos dirigidos a huertos y árboles de cítricos en la Península de Yucatán.

Infestación de Tc y pruebas moleculares	2011				2012						2013	
	Nov. 04		Dic. 02		Ene. 27		Mar. 02		Mar. 23		Marzo 19	
	Tc.	Planta	Tc.	Planta								
Huertos infest. por Tc.	2/18	-	1/17	-	2/17	-	1/17	-	1/17	-	3/18	-
Mues. ¹ / Tot. insectos	13/130	13	18/180	18	22/220	22	12/120	12	08/80	8	17/170	17
RT-PCR pos.	0/13	13/13	0/18	7/18	0/22	11/22	0/12	2/12	0/8	5/8	0/17	6/17
PCR anidado pos.	0/13	-	0/18	3/11	3/22	3/11	1/12	1/10	0/8	0/3	0/17	0/11
qRT-PCR pos.	0/13	-	7/18	-	7/22	-	8/12	-	6/8	-	8/17	-
Tot. mues. pos.	0/13	13/13	7/18	10/18	10/22	14/22	9/12	3/12	6/8	5/8	8/17	6/17
Proporción mues. pos.	0	1	0.39	0.55	0.45	0.64	0.75	0.25	0.75	0.63	0.47	0.35
Estim. Tc. virulíferos	0	-	27.2	-	45.4	-	67.5	-	45.0	-	37.6	-

¹Cada muestra consistió de 10 adultos ápteros de *T. citricida*.

La duración del ciclo de vida de *T. citricida* está determinada por las condiciones ambientales donde se desarrolla. En escenarios ideales, su período de desarrollo es de 6 a 8 días y la capacidad de una hembra en promedio es dar origen a 20 ninfas en un lapso de cuatro a cinco días. Sin embargo, la baja infestación de huertos en la Península de Yucatán sugiere que las condiciones que prevalecen en esta región no sean idóneas para potenciar la colonización de brotes en cítricos o que la población de *T. citricida* está controlada por agentes de control biológico. Se han identificado al menos 113 especies de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y entomopatógenos). En México están presentes al menos 18 de ellos (Michaud, 1998; López Arroyo *et al.*, 2008). Cortez y colaboradores (2010), aislaron e identificaron hongos entomopatógenos de la Península de Yucatán como control biológico para insectos vectores asociados a cítricos.

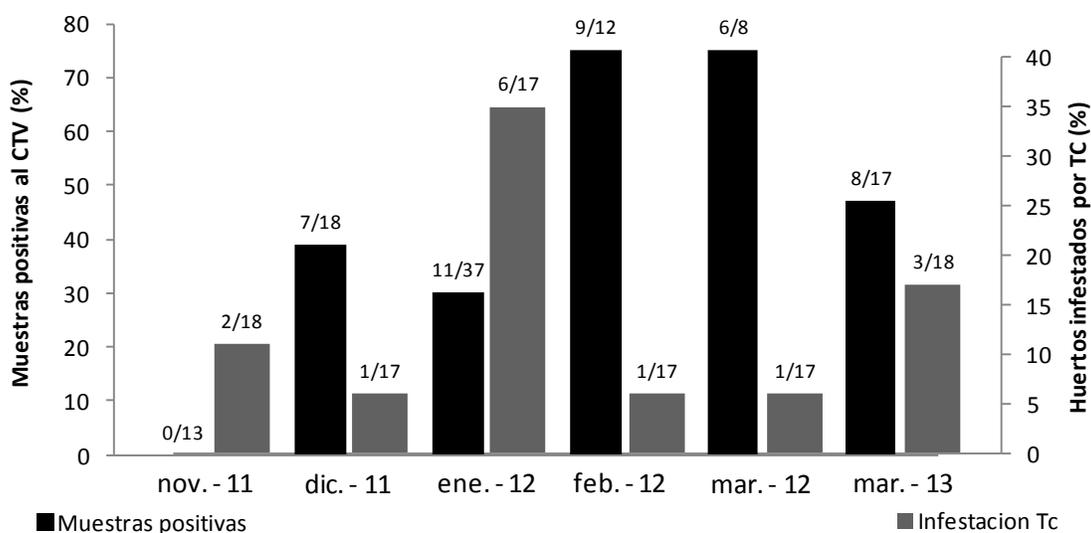


Figura 6. Infestación de Tc a nivel regional en la Península de Yucatán y relación de muestras de áfidos positivas al CTV. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

T. citricida continua su dispersión a partir de su detección en la Península de Yucatán en 2000 (Michaud y Álvarez, 2000) y se ha detectado en Tabasco, Veracruz, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Querétaro, Nayarit, Jalisco y San Luis Potosí (SENASICA, 2012). La detección más reciente en la vertiente del Pacífico fue en Jalisco en noviembre de 2011 (SENASICA 2013). En esta región se localizan dos

entidades con la mayor producción de cítricos agrios, considerados susceptibles al CTV. El comportamiento y prevalencia en esta región debe ser estudiado.

Cuadro 3. Infestación de *T. citricida* y detección del CTV en censo de cinco huertos cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo invierno de 2011 y 2012.

Entidad	Huerto	No. De pos. Históricos/Tot. de árboles ²	Injerto/Portainjerto ³	Edad	Muestras <i>T. citricida</i> positivas por prueba molecular ¹					
					2011			2012		
					RT-PCR	PCR anidado	qRT-PCR	RT-PCR	PCR anidado	qRT-PCR
Camp.	Castamay	6/127	Limón P/Cleopatra	10	0/2	0/2	0/2	0/4	0/4	0/4
Camp.	Cayal	27/278	Valencia/Agrio	20	0	0	0	0/3	0/3	0/3
Q. Roo	Sub. L.	24/400	Valencia/Agrio	15	0/1	0/1	0/1	0	0	0
Yucatán	Unión-2	1/816	Valencia/Agrio	30	0/3	0/3	0/3	0/4	0/4	1/4
Yucatán	Esperanza-4	70/337	Valencia/Agrio	30	0/39	1/39	0/39	0/4	0/4	0/4
Total	5	128/1958	-	-	0/45	1/45	0/45	0/15	0/15	1/15
Porcentaje Tc. virulíferos		-	-	-	0	2.2	0	0	0	6.6

¹ Cada muestra consistió de 10 adultos ápteros de *T. citricida*. ² Se detectaron plantas positivas a CTV por técnica de inmunopresión-Elisa (Domínguez-Mongue, 2011). ³ Valencia= *C. sinensis* var. Valencia, Limón P= *C. latifolia*, Cleopatra= *C. reshni*. Seleccionados por antecedentes históricos de condición positiva al virus.

El estudio de las poblaciones de *T. citricida* adquiere mayor importancia por ser el vector más eficiente del CTV. A este vector se le adjudica en el continente Americano la transmisión de aislamientos de tipo severo y sobresale de otros vectores ya que es capaz de transmitir la partícula viral de 6 a 25 veces más que el áfido *A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1994). Por su alto potencial reproductivo, *T. citricida* tiene la facultad de desarrollar altas poblaciones en tiempos relativamente cortos. Esto no se encontró bajo las condiciones de la PY. Sin embargo, este resultado no estima el comportamiento que *T. citricida* podría tener bajo otras condiciones climáticas en zonas cítricas de México.

DetECCIÓN DEL CTV EN MUESTRAS DE ÁFIDOS

El porcentaje de muestras de *T. citricida* positivas al CTV estuvo en un rango de 0% al 75% de un total de 18 huertos en seis fechas de muestreo de noviembre de 2011 a marzo de 2013 (Fig. 6, Cuadro 2 y 3). El número de muestras positivas de áfidos ápteros en 2011 fue de 7/18 (39%), en 2012 se obtuvo el mayor número de muestras positivas al CTV 9/12 (75%) y 6/8 (75%) en muestreos de febrero y marzo,

respectivamente (Fig. 7, Anexo 8). Hasta la primavera del 2013 el número de muestras positivas fue 8/17 (47%). Aparentemente, la mayor proporción de muestras positivas al CTV de *T. citricida* ápteros fue en febrero a marzo, en general coincidiendo con la proporción de huertos colonizados.

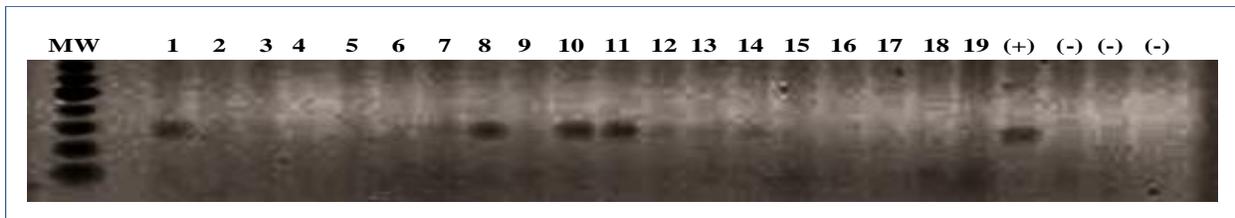


Figura 7. Detección del CTV en muestras de áfidos ápteros por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* confirmado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. Líneas 1, 8, 10 y 11 muestras positivas al virus colectadas en huerto Castamay, Campeche 2012. MW= 100 pb (Promega).

La baja proporción de insectos virulíferos contrasta con los resultados de Loeza-Kuk (2008), ya que el porcentaje de muestras de *T. citricida* positivas a CTV que reporta para Brasil fue 98% (55/56) y en *A. spiraecola* un 90% (27/30). Este contraste se puede deber a la condición endémica de CTV y la alta ocurrencia de aislamientos de tipo severo en Brasil. Bajo estas condiciones no solo *T. citricida* sino otros vectores como *A. spiraecola* pueden ser importantes vectores. Al respecto, Patiño-Arellano (2012), reporta en PY la presencia de *A. gossypii*, *A. spiraecola* y *T. aurantii*, pero en baja proporción con respecto a *T. citricida*. Estos potenciales vectores no deben descartarse en la dispersión del CTV a nivel regional. En México se ha demostrado la dispersión del CTV en ausencia de *T. citricida* (Gongora-Canul, 2004; Ruíz-García, 2008; Rivas-Valencia, 2008).

Se estimó la proporción de insectos virulíferos, de acuerdo con la ecuación propuesta. Como se observa en la Fig. 8, el cálculo obtenido de insectos virulíferos se sitúa dentro del rango máximo y mínimo de posibles insectos virulíferos. Esta estimación puede ayudar a generar una evaluación de la carga viral de *T. citricida* en

un contexto regional. En este trabajo se colectaron un total de 1500 individuos de *T. citricida* y se sugiere que de acuerdo con los cálculos realizados 223 áfidos son virulíferos al CTV (14.8%).

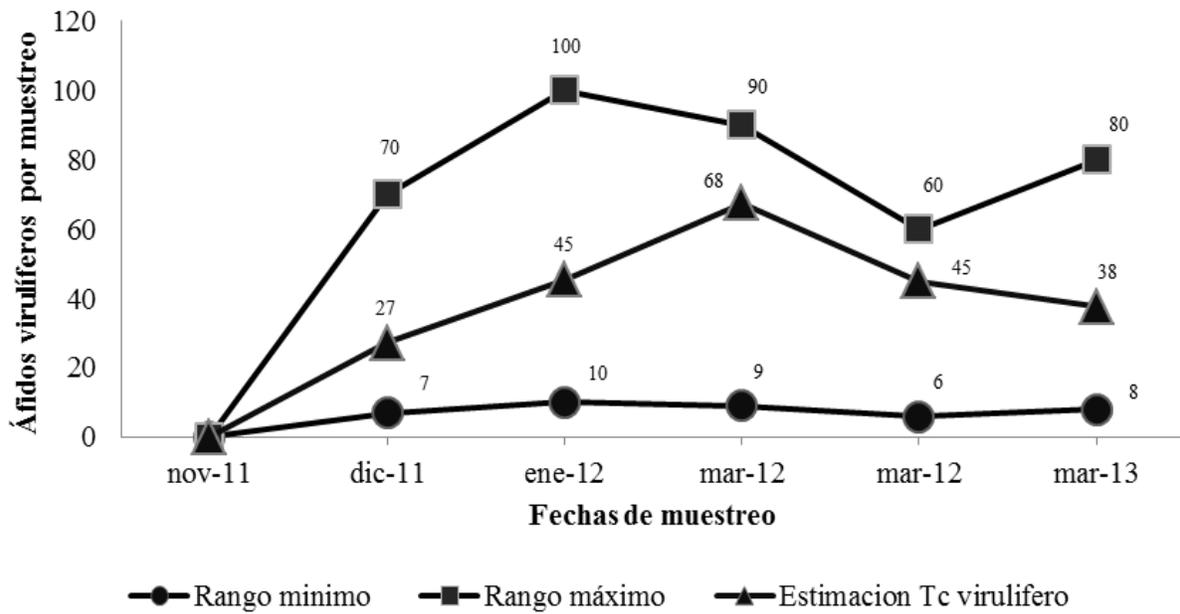


Figura 8. Valores máximos y mínimos de individuos de *T. citricida* (Tc) virulíferos y estimación de número de áfidos positivos en muestreo dirigido en árboles de cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

Detección del CTV en brote

Se colectaron 90 brotes colonizados por *T. citricida* en huertos cítricos en la Península de Yucatán (Cuadro 4): 31 en 2011, 42 en 2012 y 17 en 2013 de un total de 18 huertos en seis fechas de muestreo de noviembre de 2011 a marzo de 2013. Del total de brotes, 51/90 (57%) muestras fueron positivas al CTV. En 2011, 23/31(74%) muestras fueron positivas, en 2012 22/42 (52%) brotes fueron positivos y en 2013, 8/17 (47%) se detectó el virus (Fig. 9, Apéndice 9). Apparently la mayor proporción de muestras de brote positivas al CTV fue en el periodo de invierno.

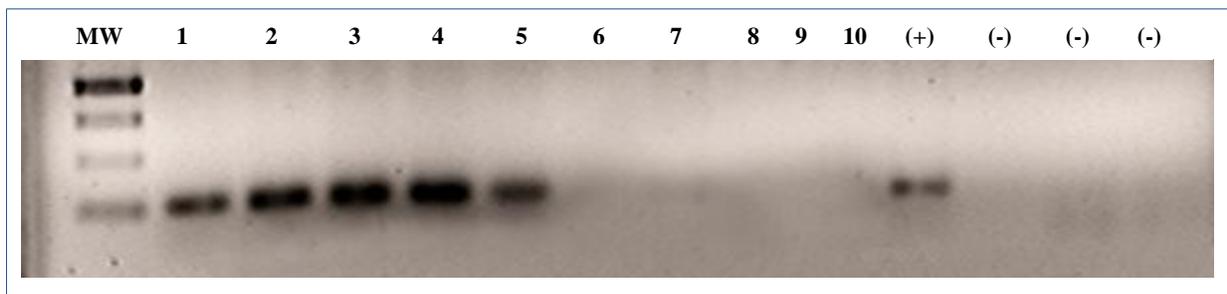


Figura 9. Detección del CTV en muestras de brotes por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. Líneas 1-5 muestras positivas al virus colectadas en huerto Castamay, Campeche 2012. MW= 1000 pb (Promega)

Coincidencia CTV en *T. citricida* /brote

La coincidencia del estatus positivo al CTV en muestras de *T. citricida* ápteros y brote colonizado respectivo exhibió valores bajos. Como se muestra en el Cuadro 4, se agruparon los resultados por entidades y se determinó que para el estado de Campeche los valores de coincidencia vector/brote fue del 0% al 38% (3/8). En 2011 no

rebasó el 28% (5/18) de coincidencia de la partícula viral del CTV en vector/brote. En 2012 el valor de coincidencia fue de 3/8 y en 2013 del 30%.

En Yucatán se determinó que hubo coincidencia del estatus positivo del CTV en muestras de *T. citricida* ápteros y brote, hasta un 33% (1/3). En 2011 y 2013 no se detectó coincidencia y en 2012 fue hasta del 33% (1/3). La coincidencia de la partícula viral del CTV en brote/*T. citricida* hace evidente procesos de interacción planta-virus debido al carácter perenne del cultivo y por el constante proceso de reinfección viral (Roy y Bransky, 2004; Vives *et al.*, 2005; Ayllón *et al.*, 2006). En la huerta ubicada en el estado de Quintana Roo no se detectó colonización de *T. citricida* en brotes de cítricos.

Cuadro 4. Coincidencia de muestras de *T. citricida* (Tc.) y brote en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

Entidad	Año	Fecha muestreo ²	Muestras positivas			Aislamiento	
			Tc.	Brote	Tc/Br ¹	Tc.	Brote
Campeche	2011	Nov 04	0/10	10/10	0/0	-	-
		Dic 02	7/18	10/18	5/18	-	T30/3
	2012	Ene 27	7/19	12/19	5/19	T36/2 T30/1	T30/5
		Mar 02	0	0	0	-	-
		Mar 23	6/8	5/8	3/8	-	-
	2013	Mar 19	6/10	6/10	3/10	-	T30/7
Yucatán	2011	Nov 04	0/3	3/3	0	-	-
		Dic 02	0	0	0	-	-
	2012	Ene 27	2/3	2/3	1/3	-	T30/1
		Mar 02	8/12	3/12	3/12	T30/1	-
		Mar 23	0	0	0	-	-
	2013	Mar 19	2/7	2/7	0	-	-

¹Coincidencia de muestras positivas a CTV de Tc y el brote de alimentación. ² Muestreo dirigido a brotes de cítricos seleccionados por antecedentes históricos de condición positiva al virus.

No existió una clara tendencia entre muestras de brotes de árboles positivos en relación a las fechas de muestreo (Fig. 10). Los valores más altos se obtuvieron en los muestreos de noviembre de 2011 y marzo del 2013 con una relación del 100% de muestras positivas (8/8 y 6/6 respectivamente). Los valores más bajos de muestras positivas al CTV en brotes fue en marzo del 2012 con un 40% (2/5).

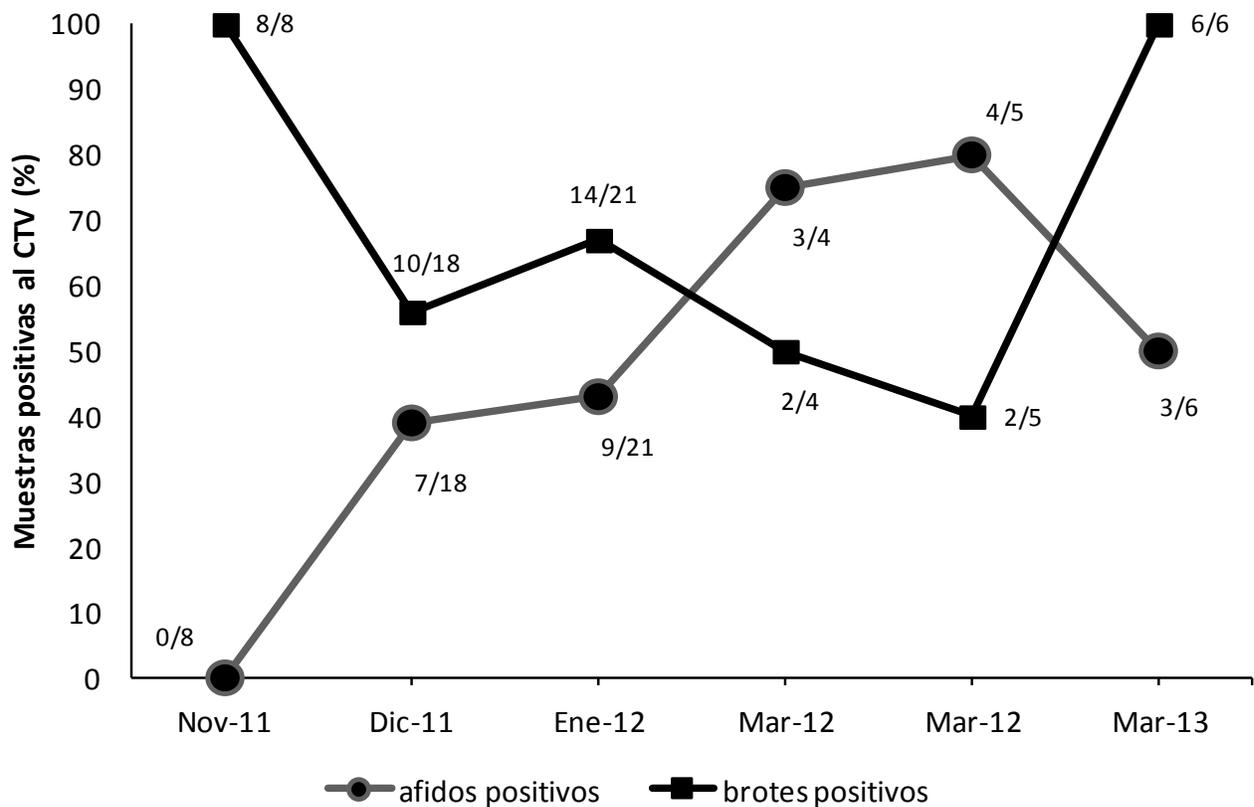


Figura 10. Comparación de muestras positivas al CTV de Tc y brote de cítricos. El muestreo fue dirigido a árboles de cítricos en el periodo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

Las muestras de *T. citricida* virulíferas provenientes de árboles con estatus positivos al CTV mostraron un incremento de acuerdo con el número de muestreos. Los valores mínimos de muestras de áfidos virulíferos al CTV se observaron en noviembre de 2011 con cero muestras positivas al virus, los valores máximos de muestras de áfidos virulíferos al CTV se registraron en marzo de 2012 (Fig. 10). Así mismo, se comparó la relación de muestras de brotes positivos provenientes de árboles históricos detectados con CTV y las muestras de áfidos ápteros positivas, se observa

una tendencia negativa, ya que el número de muestras de brote positivas al CTV disminuyen con el tiempo, mientras que sucede lo contrario con muestras positivas de áfidos ápteros. Esto puede estar relacionado con el aumento de la temperatura, ya que reportes indican que la replicación de la partícula viral disminuye en condiciones de temperatura elevadas. Sin embargo, la baja prevalencia del virus también puede causar resultados aleatorios. La condición nutricional y en general el reducido manejo de los huertos también puede influenciar al afectar la brotación (Domínguez-Monge, 2011).

Se determinó que la colonización de *T. citricida* fue más frecuente en huertos de *C. latifolia* (Cuadro 5), ya que se colectó el 72% (65/90) del total de las muestras *T. citricida*/brote, en comparación con un 28% (25/90) en huertos de *C. sinensis*, a pesar de que la mayoría de huertos muestreados eran de Naranja valencia (16/18), en comparación con limón persa (2/18). Patiño-Arellano (2012) indica una mayor frecuencia de áfidos en *C. latifolia*. La edad de los huertos pudo influir, ya que se presentó mayor infestación en aquellos con menos de 20 años de edad. En adición a la mayor frecuencia de brotación en general de los cítricos agrios y árboles jóvenes tienen un mayor índice de brotación en comparación de árboles de más edad. Así mismo, se determinó que limón persa fue el cítrico con mayor número de muestras de brote positivas al CTV (68% 44/65) (Cuadro 5). Este resultado es congruente dado que la colonización incrementa las posibilidades de transmisión viral.

Cuadro 5. Infestación y adquisición del CTV por *T. citricida* por tipo de cítrico en la Península de Yucatán. Muestreo dirigido a brotes de cítricos seleccionados por antecedentes históricos de condición positiva al virus. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

Condición de huertas y muestras a CTV	Injerto/portainjerto ¹	
	Valencia/Agrio	Limón P/Cleopatra
Huertas	16/18	2/18
Edad huertos/años	15-30	10
Muestras positivas áfidos	14/68	27/71
Muestras positivas brote	10/25	44/65

¹Valencia= *C. sinensis* var. Valencia, Limón P= *C. latifolia*, Cleopatra= *C. reshni*.

Los resultados obtenidos de infestación por punto cardinal del dosel indican que la orientación este registró la mayor colonización en Yucatán y en Campeche con un 44% (11/25) y 35% (23/65), respectivamente (Fig. 11), y los valores más bajos de colonización en Yucatán y Campeche se registraron en el punto cardinal oeste con valores de 12% (3/25) y 20% (13/65), respectivamente. Sin embargo, se determinó que en los cuatro puntos se detectó al CTV en muestras vegetales, lo que confirma heterogeneidad en la distribución de la partícula viral. Esto ya se había demostrado previamente para las condiciones de Tamaulipas (Ruiz-García *et al.*, 2008).

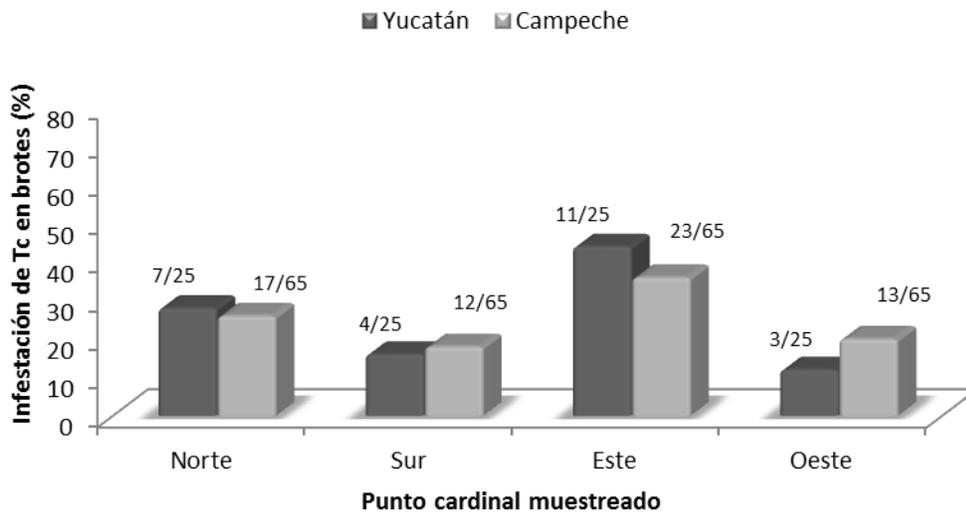


Figura 11. Infestación de *T. citricida* por punto cardinal del dosel del árbol, bajo un muestreo dirigido a brotes de cítricos en la Península de Yucatán. Periodo de muestreo otoño-invierno 2011 y primavera 2012 y 2013.

En el huerto Castamay, Campeche, cinco arboles sumaron el 72% del total de muestras obtenidas, lo que indica una alta agregación del vector. En Yucatán no se observó este nivel de intensidad de agregación por *T. citricida* (Fig. 12 y 13).

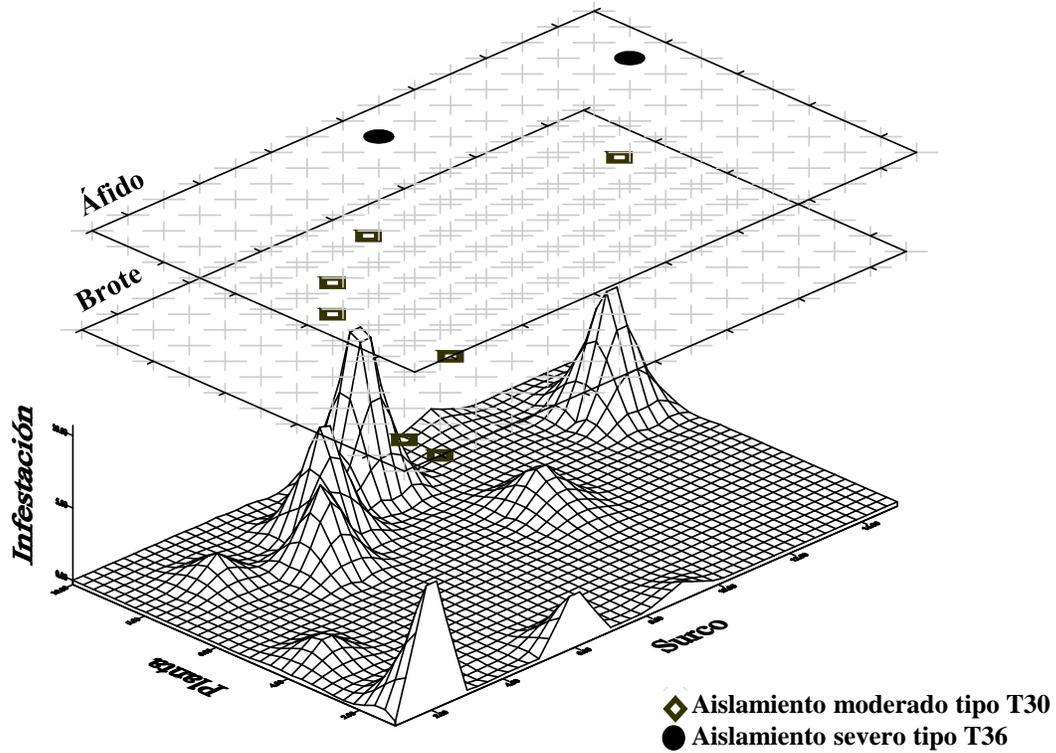


Figura 12. Mapa espacial interpolado de infestación de *T. citricida* y distribución de dos aislamientos del CTV en limón persa (*C. latifolia*). Huerto Castamay, Campeche, 2012.

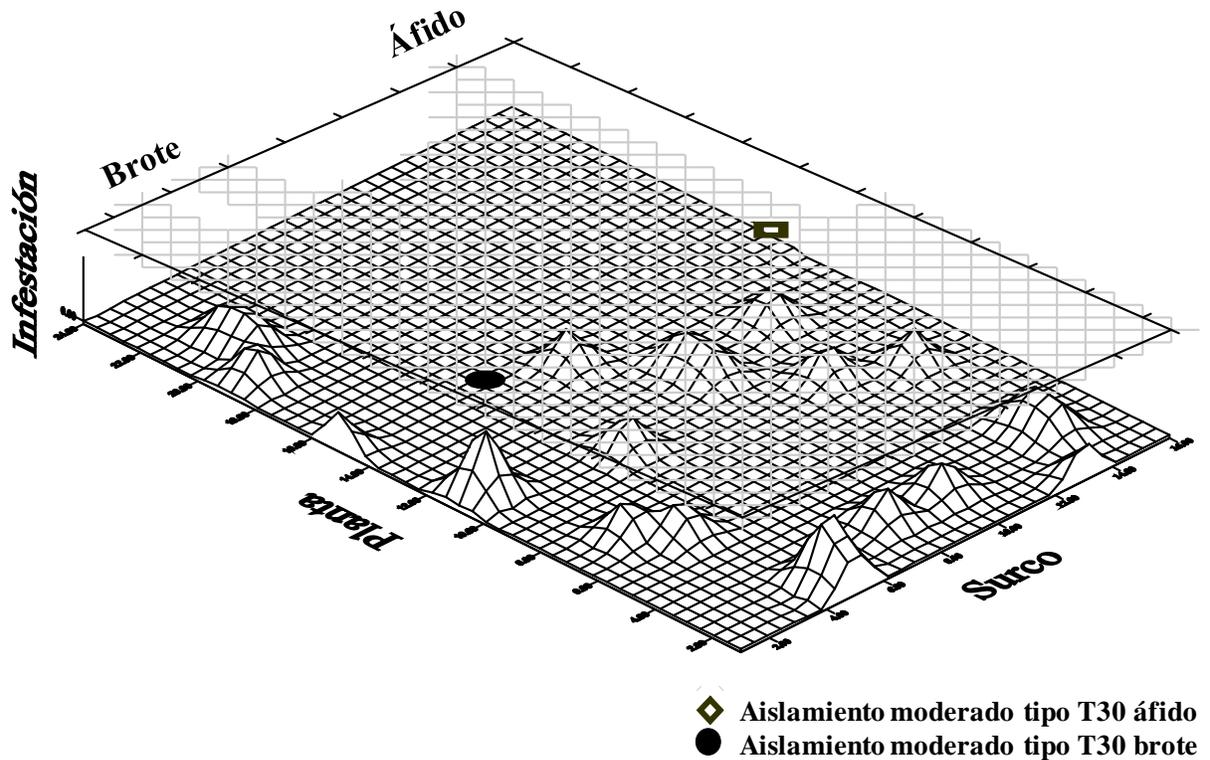


Figura 13. Mapa espacial interpolado de infestación de *T. citricida* y distribución de dos aislamientos del CTV en naranja Valencia (*C. sinensis*). Huerto Esperanza-4, Yucatán, 2012.

Se secuenciaron cuatro muestras positivas al CTV de áfido y 16 de brote. Tres secuencias de áfido pertenecen al huerto Castamay, dos de ellas fueron similares a aislamiento severo tipo T36 (Cuadro 4, Fig. 12 y 13), la restante fue similar al aislamiento moderado tipo T30; 16 secuencias de brote fueron similares a aislamiento moderado tipo T30, por tanto no hubo coincidencia con los aislamientos severos encontrados en áfido. En el huerto Esperanza-4, Yucatán se obtuvo la secuencia de una muestra positiva de áfido y brote las cuales fueron similares a aislamiento moderado T30, no hubo coincidencia vector/brote. En la naturaleza, el CTV se presenta como una mezcla de aislamientos en el mismo huésped. Se reporta que *T. citricida* tiene la capacidad de seleccionar aislamientos de tipo severo, probablemente sea la razón de que no exista coincidencia de aislamientos en brote y vector. Así mismo se menciona que un aislamiento predomina en una población de CTV, esto se ratifica con

lo obtenido en la secuencia de aislamiento en planta donde aparentemente las condiciones favorecen la replicación y dominancia del aislamiento tipo T30. Esto puede atribuirse a efectos combinados de presión de selección de esta manera pueden generarse genomas funcionales de CTV bajo condiciones específicas. Roy y Brlanski (2009) mencionan que la presencia de especies de áfidos puede generar cambios en la estructura poblacional del virus al seleccionar aislamientos y subaislamientos de CTV. Trabajos como el de Herrera-Isidró y colaboradores (2009) indican que en México las poblaciones de CTV son una mezcla de aislamientos con distintas propiedades biológicas y genéticas con dominancia de aislamientos moderados tipo T30 y T385. En este trabajo se confirmó la prevalencia de T30 en planta.

A pesar de que en esta investigación se determinaron secuencias de aislamientos de tipo severo en vector, no sucede lo mismo con secuencias de brotes. De acuerdo con Rubio y colaboradores (2001) y Brlansky y colaboradores (2003), en la naturaleza existen poblaciones de aislamientos de CTV; sin embargo, este conjunto de aislamientos compiten y suprimen la expresión patogénica de sus competidores. En este trabajo la prevalencia de T30 en planta sugiere posibles efectos de supresión de aislados de tipo severo como el T36 detectado en áfidos ápteros. La condición áptera del vector sugiere que el aislamiento podría estar en la planta pero suprimido en su población y/o distribución. Este aspecto requiere estudios posteriores.

Estudios recientes mostraron ocurrencia de hasta siete haplotipos y cambios en su frecuencias en la población de CTV en un huerto de Yucatán (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia *et al.*, 2010). La prevalencia del aislamiento de tipo moderado en tejido vegetal podría explicar la ausencia de epidemias de alta intensidad como los reportados en otros países (Rocha-Peña *et al.*, 1995). En este trabajo los cítricos infectados en campo fueron asintomáticos y no manifestaron declinamiento repentino. Por tanto, es necesario diferenciar entre un haplotipo que representa una subpoblación con un perfil electroforético diferencial, pero no necesariamente con características biológicas y patogénicas diferenciales para considerarse un aislamiento. La

caracterización de aislamientos de CTV a nivel regional es importante para la prevención de epidemias y el control de la enfermedad.

En este trabajo se hizo énfasis en conocer la implicación de *T. citricida* en el patosistema cítrico-CTV. Sin embargo no se deben excluir otras especies de potenciales vectores reportados previamente por Patiño-Arellano (2012).

Actualmente existen zonas citrícolas donde abunda *T. citricida* sin ocasionar epidemias intensas como en Brasil (Komazaki, 1994; Carrera y Carmeli, 2003; Menjivar *et al.*, 2003). Sin embargo, esto se debe al cambio de patrones tolerantes y no indica pérdida de capacidad del vector para transmitir al virus o pérdida de la capacidad agresiva del virus.

Con los resultados obtenidos se determina que el patosistema de la tristeza de los cítricos es complejo, intervienen múltiples factores como la susceptibilidad del hospedante, eficiencia en transmisión y dispersión del virus por *T. citricida* y otras especies de áfidos vectores, el clima, manejo del huerto y los aislamientos existentes en el área. En México, el CTV está presente desde 1983 y *T. citricida* desde 2000 en la Península de Yucatán (Michaud y Álvarez, 2000). Esta patosistema ha sido ampliamente estudiada en la región por Loeza-Kuk (2008), Rivas-Valencia (2008), Domínguez-Monge (2010) y Patiño-Arellano (2012). El presente trabajo contribuye con información sobre la relación *T. citricida*-CTV-cítrico y aporta evidencias de la presencia de aislamientos y su prevalencia.

3.4. CONCLUSIONES

En 2.5 años se detectó a *T. citricida* (Tc) en huertos citrícolas de la Península de Yucatán en un rango de infestación del 6% (1/17) al 35% (6/17). Se determinó que la colonización de Tc fue más frecuente en limón persa (*C. latifolia*) con un 72% (65/90). La mayor infestación de Tc ocurrió en Yucatán y Campeche en brotes orientados al este del dosel del árbol con 44% (11/25) y 35% (23/65), respectivamente.

El porcentaje de muestras Tc positivas estuvo en un rango de 0% a 75%. El mayor número de muestras de áfidos positivos fue en febrero y marzo 2012 con 75% (9/12 y 6/8, respectivamente). De 1500 individuos colectados se estimaron 223 áfidos virulíferos (14.8%).

El porcentaje de brotes de cítricos positivos al CTV fue de 57% (51/90). Se determinó baja coincidencia en la condición positiva al CTV en la relación Tc-brote. En Campeche los valores de coincidencia positiva Tc-brote no rebasó el 38% (3/8). En Yucatán los valores de coincidencia no superó el 33% (1/3).

De cuatro muestras de áfidos secuenciadas, 2/4 y 2/4 fueron similares a un aislamiento severo y moderado tipo T36 y T30, respectivamente. De 17 muestras positivas de brote se determinó la dominancia (17/17) de un aislamiento moderado tipo T30.

Se confirma la baja prevalencia y virulificidad de Tc en la Península de Yucatán, así como la prevalencia de un aislado de tipo moderado. Sin embargo, la detección de un aislado tipo severo (T36) en el vector sugiere la necesidad de conducir estudios sobre la selección de variantes por Tc y cambio en la prevalencia de este tipo de aislado en el tiempo.

LITERATURA CITADA

- 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.
- 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 México. *Plant Disease* 81: 693.
- Cortez-Madrugal H., R. Munguia-Rosales, G. Mora-Aguilera, R. Humber y A. Borges-Evia. 2010. Hongos entomopatógenos en cítricos en la Península de Yucatán con Enfasis en *Diaphorina citri*. V reunión Nacional de Innovación Agrícola.
- Domínguez-Monge S. 2011. Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 60 p.
- Freitas-Astúa J., E. C. Locali, R. Antonolo, V. Rodríguez, E.W. Kitajima, and M. A. Machado. 2003. Detection of *Citrus leprosis virus* in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Review Research* 8: 196.
- Góngora-Canúl C. 2004. Regionalización de establecimiento y caracterización espacial de focos del *Citrus tristeza closterovirus* en Tamaulipas, México. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegios de Postgraduados. 145 pp.
- Halbert S. E., and L. G. Brown. 1996. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), brown citrus aphid identification, biology and management strategies. Florida Department of Agriculture & Consumer Services Division of Plant Industry, Entomology 6 p.
- Herrera-Isidrón L., Ochoa-Sánchez, J.C., Rivera-Bustamante, R., Martínez-Soriano, J.P. 2009. Sequence diversity on four ORFs of *Citrus tristeza virus* correlates with pathogenicity. *Virology Journal* 6:116.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Salcedo-Baca D., R. A. Hinojosa, G. Mora-Aguilera, I. Covarrubias-Gutiérrez, F. J. R. DePaolis, J. S.

- Mora-Flores, C. L. Cintora. 2010. Evaluación del impacto económico del Huanglongbing (HLB) en la cadena citrícola Mexicana. SAGARPA.
- Komazaki S. 1982. Effects of constant temperatures on population growth of three aphid species, *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy), *Aphis citricola* van der Goot and *Aphis gossypii* Glover (Homóptera: Aphididae) on citrus. *Applied Entomology and Zoology* 17: 75-81.
- Komazaki S. 1994. Ecology of citrus aphids and their importance to virus transmission. *Japan Agricultural Research Quarterly* 28:117-184
- 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.
- Loeza-Kuk, E. 2008. Características epidemiológicas y moleculares de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Veracruz, Tamaulipas y Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 103 p.
- Loeza-Kuk E., D. L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, M. A. Gutiérrez-Espinosa, W. Cintra de Jesús Junior, A. Villegas-Monter, N. Arno-Wulff, and E. Pérez-Molphe-Balch. 2008. Detection of *Citrus sudden death-associated virus* and haplotypes of *Citrus tristeza virus* in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and implication on citrus sudden death in Brazil. *Agrociencia* 42: 669-678.
- Michaud J. P. 1999. Sources of mortality in colonies of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* Kirkaldy. *Biocontrol* 44:347-367.
- Michaud J. P., and R. Álvarez-Ramos. 2000. First collection of Brown Citrus Aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera Aphididae) in Quintana Roo, México, Florida *Entomologist* 83: 357-358.
- Narváez G., S. B. Slimane, M. A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, and P. Moreno. 2000. A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* by hybridization with digoxigenin-labelled. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.

- Nolasco G., C. de Blas, V. Torres and F. Ponz. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45: 201-218.
- Ordúz-Rodríguez J. O. y G. Fischer. 2007. Balance hídrico e influencia del estrés hídrico en la inducción y desarrollo floral de la mandarina "Arrayana" en el piedemonte llanero de Colombia. *Agronomía Colombiana* 25: 255-263.
- Patiño-Arellano S. A. 2011. Complejo de áfidos y riesgo de dispersión del virus de la tristeza de los cítricos en la Península de Yucatán. Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. 63 p.
- Quereshi J. A. 2010. Implications of climate change for *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), a disease vector of citrus in Florida. Chapter 6. *Aphid Biodiversity Under Environmental Change*. 191 p.
- Rivas-Valencia P. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. 131 pp.
- Rivas-Valencia P., E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, N. Ruiz-García, D. L. Ochoa-Martínez, A. Gutiérrez-Espinoza, y V. Febres. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* en Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1:493-507.
- Rocha-Peña M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Nibblet, F. M. Ochoa-Corona, S. M. Garnsey and R. K. Yokomi. 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79: 437-445.
- Rojas L., O. Portal, and E. Jiménez. 2011. Extracción de ARN total en plantas y hongos filamentosos. *Biotecnología Vegetal* 11: 213-222.
- Roy A., and R. H. Bransky. 2009. Population dynamics of a Florida *Citrus tristeza virus* isolate and aphid-transmitted subisolates: Identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99: 1297-1306.

- Ruiz-García N. 2008. Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados. 105 pp.
- Ruiz-García N., G. Mora-Aguilera, P. Rivas-Valencia, C. Góngora-Canul, E. Loeza-Kuk, D. Ochoa-Martínez, G. Ramírez-Valverde, M. A. Gutierrez-Espinosa, y R. Álvarez-Ramos. 2008. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15:41-47.
- Saponari M., K. Manjunath, and R. K. Yokomi. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* 147: 43-53.
- SINAVEF. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 2012. Ficha técnica pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldi). Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Mexico, D.F. 24 p.
- Stoetzel M. B. 1994. Aphids (Homoptera: Aphididae) of potential importance on *Citrus* in the United States with illustrated keys to species. *Proceeding of the Entomological Society Washington* 96: 74-90.
- Villegas J. N. 2003. Biología y morfometría de las principales especies de áfidos (Homoptera: Aphididae) vectores de virus en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 203 pp.

APÉNDICE

APÉNDICE A.1. Materiales necesarios para colecta de áfidos y tejido vegetal en brotes de cítricos.

- Frascos de plástico de aprox. 2x4 cm (Fig. A)
- Alcohol al 70%. De contar con alcohol al 96% se puede preparar llenando un poco más de tres cuartas partes de alcohol en una botella de 1litro y completar con agua
- Lápiz, goma, sacapuntas
- Etiquetas
- Pincel
- Hielera con hielos Tijeras de podar
- Formatos de colecta
- Agua
- Bolsa de plástico
- Marcador indeleble
- Pintura en aerosol
- GPS



A

APÉNDICE A.2. Extracción de RNA total en muestras de áfidos adultos ápteros (protocolo modificado por Freitas-Astúa, 2003).

1. Emplear 10 áfidos, evaporar el alcohol de preservación con ayuda de papel secante.
2. Depositar los áfidos y agregar nitrógeno líquido.
3. Añadir 25 µL de CTAB 2% y triturarlos con un pistilo estéril.
4. Agregar 25 µL de B-Mercaptoetanol, mezclar en vortex e incubar la muestra por 15 minutos a 55 °C.
5. Adicionar 150 µL de Cloroformo:Alcoholisoamílico en una proporción 24:1. Mezclar en vortex.
6. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
7. Transferir 35 µL de sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Repetir la extracción con 100 µL de cloroformo: alcohol isoamílico.
9. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
10. Transferir 30 µL del sobrenadante a un tubo nuevo.
11. Adicionar 3 µL de acetato de amonio 7.5 M y 30 µL de isopropanol. Mezclar ligeramente e incubar la muestra a temperatura de -20 °C por 60 minutos.
12. Centrifugar a 12 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
13. Descartar el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó.
14. Adicionar 1 ml de etanol al 70 %. Centrifugar a 12 000 rpm durante 1 minuto a 4 °C.
15. Descartar el sobrenadante. Dejar evaporar el alcohol a temperatura ambiente.
16. Resuspender la pastilla en 30 µL de agua libre de RNAsas.
17. Almacenar la muestra a -20 °C.

APÉNDICE A.3. Extracción de RNA total en muestras de tejido vegetal (Harris, 2002).

1. Depositar en tubo eppendorf 0.05 gramos de tejido vegetal. Mantener la muestra en cooler.
2. Colocar dos balines dentro del tubo. Agregar 600 μ L de buffer salino.
3. Macerar muestra a 20 frecuencias/segundo (f/s) por 5 minutos.
4. Centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos a 4°C.
5. Descartar sobrenadante y retirar cuidadosamente los balines.
6. Agregar 600 μ L de CTAB al 2% y 3 μ L de B-Mercaptoetanol al 100%. Mezclar la muestra en vortex por 10 segundos. Incubar a 55°C por 30 minutos.
7. Agregar 400 μ L de Fenol:Cloroformo:Alcoholisoamilico en una proporción 25:24:1 respectivamente. Mezclar en vortex por 10 segundos.
8. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C.
9. Colectar 500 μ L de la fase acuosa en un tubo nuevo evitando que se mezclen las fases, se recomienda extraer la fase acuosa en volúmenes de 100 μ L.
10. Agregar 50 μ L de acetato de amonio y 500 μ L de isopropanol. Incubar por 10 minutos a temperatura de -20 °C.
11. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 14 000 rpm a 4°C y descartar el sobrenadante sin perder la pastilla que se formó.
12. Adicionar 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar 1 minuto a 14 000 rpm a 4°C.
13. Secar la muestra a temperatura ambiente hasta que se haya evaporado por completo el etanol.
14. Resuspender la pastilla en 50 μ L de agua libre de RNAase.
15. Almacenar la muestra a -20 °C.

APÉNDICE A.4. Valores de concentración y calidad de RNA total en áfidos.

No. de muestra	Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
M11	87.5 ng/μL	2.07	1.94
M12	105.6 ng/μL	2.07	1.95
M13	2.2 ng/μL	0.35	-0.19
M14	14.1 ng/μL	1.09	-1.16
M15	93.4 ng/μL	1.44	0.6
M16	251 ng/μL	2.11	2.1
M17	454.1 ng/μL	2.05	2.29
M18	104.5 ng/μL	2.05	2.19
M19	44.1 ng/μL	2.06	1.82
M20	70.9 ng/μL	2.05	1.82
M21	5 ng/μL	1.85	0.46
M22	14.3 ng/μL	2.23	1.55
M23	25.2 ng/μL	1.97	1.39
M24	17 ng/μL	1.8	1.14
M25	49.6 ng/μL	1.88	1.99
M26	4.6 ng/μL	2.11	0.67
M27	53.2 ng/μL	1.78	2.56
M29	30.7 ng/μL	2.09	1.5
M30	687.9 ng/μL	2.1	2.06
M31	7 ng/μL	0.8	-6.05
M32	37.3 ng/μL	1.99	1.33
M33	44.7 ng/μL	1.99	1.61
M34	5.9 ng/μL	1.03	0.78
M35	16.1 ng/μL	2.07	1.18
M36	140.9 ng/μL	2.03	1.86
M37	168.6 ng/μL	2	1.5
M38	12.4 ng/μL	1.57	1.04
M39	110.7 ng/μL	2.07	1.58
M40	44.7 ng/μL	1.99	1.13
M41	51 ng/μL	1.92	1.22
M42	20.5 ng/μL	1.88	0.66
M43	42.7 ng/μL	2.05	0.85
M44	61.3 ng/μL	2	1.13
M45	929.6 ng/μL	2.09	2.23
M46	366 ng/μL	2.12	2.23
M47	125 ng/μL	2.04	1.8
M48	63.5 ng/μL	2.06	1.24
M49	503.2 ng/μL	2.04	2.12

APÉNDICE A.4. Valores de concentración y calidad de RNA total en ácidos (continuación...)

No. de muestra	Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
M50	349.8 ng/μL	2.1	2.09
M51	72.6 ng/μL	2.05	2.18
M52	190.3 ng/μL	2.04	1.92
M53	48 ng/μL	2.07	1.88
M54	83.4 ng/μL	2.1	2.05
M55	19.9 ng/μL	2.04	1.55
M56	360.4 ng/μL	2.09	2.06
N582	3086.6 ng/μL	2.08	2.14
N583	1868.1 ng/μL	2.06	2.17
N584	3431 ng/μL	2.05	2.09
N585	1534.8 ng/μL	2.07	2.11
N586	2271 ng/μL	2.07	2.14
N587	1388 ng/μL	2.1	2.04
N588	3291 ng/μL	2.08	2.12
N589	1323.4 ng/μL	2.03	2.09
N590	1857.6 ng/μL	2.06	2.18
N591	49.1 ng/μL	1.84	1.15
N592	1195.6 ng/μL	2.12	2.13
N593	2223.7 ng/μL	2.1	2.23
N594	1900.7 ng/μL	2.1	2.19
N595	860.4 ng/μL	2.09	2.15
N596	3569.7 ng/μL	2.07	2.1
N597	1397.2 ng/μL	2.03	2.17
N598	102.9 ng/μL	1.92	2.02
N599	97.5 ng/μL	2.01	2.16
A622	428.5 ng/μL	2.02	2.35
A623	290.8 ng/μL	2	2.33
A624	133.9 ng/μL	1.92	2.12
A625	182.7 ng/μL	2.04	2.05
A626	649.6 ng/μL	1.29	1.61
A627	152.7 ng/μL	1.98	1.79
A628	272.4 ng/μL	2.03	2.2
A629	677.1 ng/μL	2.02	2.28
A630	816 ng/μL	2.03	2.26
A631	682.1 ng/μL	1.99	2.26
A632	636.8 ng/μL	2.02	2.25
A633	528.6 ng/μL	1.94	2.35
A634	201.8 ng/μL	1.92	2.64
A635	146.5 ng/μL	1.38	1.05
A636	443 ng/μL	2.03	2.23

APÉNDICE A.4. Valores de concentración y calidad de RNA total en áfidos (continuación...)

No. de muestra	Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
A637	357.7 ng/μL	1.94	1.92
A638	1230.6 ng/μL	2.07	2.24
A639	492.6 ng/μL	2	2.08
A640	439.1 ng/μL	2	2.25
A641	449.2 ng/μL	2.04	2.21
A642	453.8 ng/μL	1.99	2.36
A643	283.9 ng/μL	1.98	2.31
A644	462.6 ng/μL	2	2.09
A645	457.2 ng/μL	1.98	2.14
A646	238.5 ng/μL	1.98	2.31
A647	88 ng/μL	1.98	2.17
A648	132.1 ng/μL	2	1.65
A649	402.4 ng/μL	2	2.24
A650	410.4 ng/μL	2.05	2.18
A651	461.4 ng/μL	2	2.18
A652	267.2 ng/μL	1.92	2.19
A653	97.2 ng/μL	2.04	1.55
A654	88.3 ng/μL	2	1.73
A655	222.4 ng/μL	1.92	2.68
A656	163.1 ng/μL	1.99	2.61
A657	516.5 ng/μL	1.99	2.36
A658	420.8 ng/μL	2.07	2.24
A659	429.4 ng/μL	2.05	2.22
A660	155.8 ng/μL	2.04	1.89
A661	334.2 ng/μL	2.01	2.27
A662	53.1 ng/μL	1.98	1.37
A663	92.3 ng/μL	2.06	1.53
A664	447 ng/μL	2.02	2.28
A665	408.6 ng/μL	2.06	2.27
A522	29.6 ng/μL	2.01	1.24
A523	20.3 ng/μL	1.5	1.96
A524	3.4 ng/μL	2.77	1.23
A525	76 ng/μL	1.9	2.11
A526	9 ng/μL	1.76	0.66
A527	110.8 ng/μL	1.98	1.95
A528	9.3 ng/μL	1.61	0.89
A529	1.3 ng/μL	2.26	0.89
A530	13.8 ng/μL	2.18	1.29
A531	152.5 ng/μL	2.02	2.33
A532	130.7 ng/μL	1.98	2.18

APÉNDICE A.4. Valores de concentración y calidad de RNA total en áfidos (continuación...)

No. de muestra	Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
A533	5.4 ng/μL	2.51	0.86
A534	20.8 ng/μL	2.02	1.61
A535	10.3 ng/μL	2.37	0.68
A536	30.4 ng/μL	2.03	1.92
C.1	162.3 ng/μL	1.96	2.27
C.2	302.8 ng/μL	2.01	2.08
C.3	165.8 ng/μL	1.93	1.94
C.4	272.6 ng/μL	1.96	2.12
C.5	231.8 ng/μL	1.99	2.09
C.6	309.6 ng/μL	1.99	2.17
C.7	429 ng/μL	1.93	2.11
C.8	319 ng/μL	2.02	2.19
C.9	401.9 ng/μL	1.98	2.24
C.10	113.6 ng/μL	1.92	2.01
S.11	163.3 ng/μL	2.01	2.21
E.12	122.6 ng/μL	1.93	2.04
E.13	132.2 ng/μL	1.93	2.08
E.14	120.4 ng/μL	1.92	2
E.15	171.2 ng/μL	1.99	2.08
E.16	467.9 ng/μL	1.96	2.19
E.17	325.4 ng/μL	2.03	2.16

APÉNDICE A.5. Valores de concentración y calidad de RNA total en planta.

No. De muestra	Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230	
1	579.3	ng/ μ L	2.09	2.15
2	248.4	ng/ μ L	2.05	2.22
3	585.4	ng/ μ L	2.03	1.95
4	373.9	ng/ μ L	2.07	2.05
5	391.5	ng/ μ L	2.08	2.16
6	240.4	ng/ μ L	2.07	2.06
7	417.4	ng/ μ L	2.02	2.07
8	280.1	ng/ μ L	2.04	2.05
9	354.6	ng/ μ L	2.04	2.03
10	458.5	ng/ μ L	2.02	2.09
11	679.3	ng/ μ L	2.07	2.06
12	529.3	ng/ μ L	2	1.76
13	222.2	ng/ μ L	2.04	2.09
14	327	ng/ μ L	2.06	2.16
15	196.2	ng/ μ L	1.99	2.07
16	308.6	ng/ μ L	2	1.95
17	296.7	ng/ μ L	2.01	1.86
18	250.3	ng/ μ L	2.03	2.12
19	181.5	ng/ μ L	2	2.1
20	162.1	ng/ μ L	2.04	2.2
21	361.8	ng/ μ L	2.04	2.04
22	376.6	ng/ μ L	2.03	2.04
23	276.9	ng/ μ L	2.02	2
24	226.5	ng/ μ L	2.05	2.05
25	693	ng/ μ L	2.12	2.27
26	216.3	ng/ μ L	2	2.09
27	430.9	ng/ μ L	2.05	2.25
28	603.8	ng/ μ L	2.07	2.16
29	223.9	ng/ μ L	2.04	2.15
30	475.3	ng/ μ L	2.11	2.22
31	372.8	ng/ μ L	2.1	2.23
32	382.7	ng/ μ L	2.06	2.17
33	196.3	ng/ μ L	2.05	2.23
34	561.5	ng/ μ L	2.12	2.28
35	183.6	ng/ μ L	2.02	2.01
36	161.1	ng/ μ L	1.98	2.01
37	385.5	ng/ μ L	2.06	1.99
38	373.1	ng/ μ L	2.1	1.96

APÉNDICE A.5. Valores de concentración y calidad de RNA total en planta (continuación...)

No. De muestra		Concentración	Absorbancia 260/280	Absorbancia 260/230
39	169.4	ng/μL	2.04	2
40	499.1	ng/μL	2.11	2.21
41	430.8	ng/μL	2.1	2.27
42	278.5	ng/μL	1.91	1.09
43	532.3	ng/μL	2.11	2.2
44	411.6	ng/μL	2.11	2.32
45	265.1	ng/μL	2.05	1.88
46	377.2	ng/μL	2.1	2.22
47	253	ng/μL	2.03	1.76
48	451.5	ng/μL	2.09	2.15
49	333.2	ng/μL	2.09	2.24
C.1	102.7	ng/μL	2.02	2.16
C.2	170.7	ng/μL	2.06	2.13
C.3	287.2	ng/μL	2.05	1.98
C.4	270.8	ng/μL	2.03	1.7
C.5	231.3	ng/μL	2.08	2.15
C.6	225.7	ng/μL	2.05	1.79
C.7	502.6	ng/μL	2.12	2.13
C.8	261	ng/μL	2.09	2.17
C.9	309.3	ng/μL	2.08	1.95
C.9	309.8	ng/μL	2.06	2.04
S.11	179.4	ng/μL	2.05	1.88
E.12	169	ng/μL	1.98	1.47
E.13	155.5	ng/μL	2.08	1.88
E.14	74.2	ng/μL	2.03	1.92
E.15	102.2	ng/μL	2.04	1.91
E.16	92.3	ng/μL	1.96	1.94
E.17	192.2	ng/μL	1.94	1.86

APÉNDICE A.6. Detección de CTV en planta por RT-PCR, PCR anidado.

ESTADO	HUERTO	MUESTRA	RT-PCR	PCR ANIDADO
CASTAMAY	CAMPECHE	N 548	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 549	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 550	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 551	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 552	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 553	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 554	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 555	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 556	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	N 557	+	-
ESPERANZA	YUCATAN	N 558	+	-
ESPERANZA	YUCATAN	N 559	+	-
ESPERANZA	YUCATAN	N 560	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	1	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	2	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	3	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	4	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	5	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	6	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	7	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	8	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	9	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	10	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	11	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	12	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	13	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	14	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	15	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	16	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	17	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	18	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	19	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	20	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	21	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	22	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	23	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	24	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	25	+	-

APÉNDICE A.6. Detección de CTV en planta por RT-PCR, PCR anidado (continuación...)

ESTADO	HUERTO	MUESTRA	RT-PCR	PCR ANIDADO
CASTAMAY	CAMPECHE	26	-	+
CASTAMAY	CAMPECHE	27	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	28	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	29	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	30	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	31	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	32	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	33	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	34	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	35	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	36	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	37	-	+
ESPERANZA	YUCATÁN	38	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	39	+	-
ESPERANZA	YUCATÁN	40	+	-
ESPERANZA	YUCATÁN	41	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	42	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	43	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	44	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	45	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	46	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	47	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	48	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	49	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C1	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C2	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C3	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C4	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C5	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C6	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C7	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C8	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.1	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.2	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.3	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.4	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.5	+	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.6	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.7	-	-

APÉNDICE A.6. Detección de CTV en planta por RT-PCR, PCR anidado (continuación...)

ESTADO	HUERTO	MUESTRA	RT-PCR	PCR ANIDADO
CASTAMAY	CAMPECHE	C.8	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.9	-	-
CASTAMAY	CAMPECHE	C.10	+	-
SAMAHIL	YUCATÁN	S.11	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.12	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.13	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.14	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.15	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.16	-	-
ESPERANZA	YUCATÁN	E.17	-	-

APÉNDICE A.7. Detección de CTV en áfidos por RT-PCR, PCR anidado, qRT-PCR.

MUESTRA	HUERTO	ESTADO	Muestreo	UBICACIÓN	RT-PCR	ANIDADO	qRT-PCR	PCR IOBANA
N 548	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L2A1	-	-	-	-
N 549	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L2A1	-	-	-	-
N 550	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L3A8	-	-	-	-
N 551	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L6A1	-	-	-	-
N 552	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L6A1	-	-	-	-
N 553	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L6A1	-	-	-	-
N 554	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L6A1	-	-	-	-
N 555	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L8A9	-	-	-	-
N 556	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L11A10	-	-	-	-
N 557	CASTAMAY	CAMPECHE	04/11/2011	L14A8	-	-	-	-
N 558	ESPERANZA	YUCATAN	06/11/2011	L2A11	-	-	-	-
N 559	ESPERANZA	YUCATAN	06/11/2011	L5A2	-	-	-	-
N 560	ESPERANZA	YUCATAN	06/11/2011	L5A1	-	-	-	-
N582	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L6A8	-	-	+	+
N583	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L8A9	-	-	+	-
N584	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L6A8	-	-	+	-
N585	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L6A8	-	-	-	-
N586	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L6A8	-	-	-	-
N587	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L5A7	-	-	+	-
N588	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L8A9	-	-	+	-
N589	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L5A7	-	-	-	-
N590	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L6A8	-	-	-	-
N591	CASTAMAY	CAMPECHE	02/12/2011	L5A7	-	-	-	-
N592	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L14A8	-	-	+	-
N593	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L6A8	-	-	-	-
N594	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L2A1	-	-	-	-
N595	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L14A8	-	-	-	-
N596	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L6A8	-	-	-	-
N597	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L2A2	-	-	+	-
N598	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L2A1	-	-	-	-
N599	CASTAMAY	CAMPECHE	28/11/2011	L14A8	-	-	-	-
A622	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L2A1	-	-	-	-
A623	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L2A1	-	-	-	-
A624	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L3A8	-	-	-	-
A625	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L5A7	-	-	-	-
A626	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L5A7	-	-	-	-
A627	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L8A9	-	-	-	-
A628	ESPERANZA	YUCATÁN	27/01/2012	L10A3	-	-	+	+

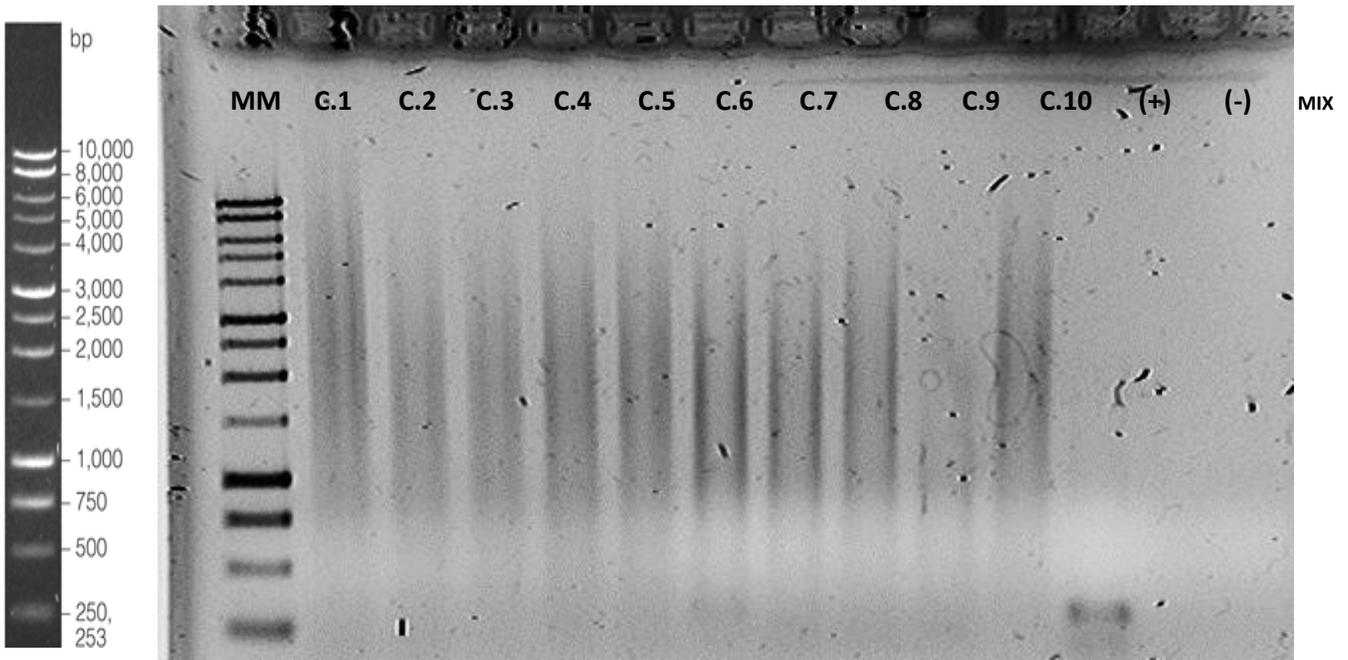
APÉNDICE A.7. Detección de CTV en áfidos por RT-PCR, PCR anidado, qRT-PCR (continuación...)

MUESTRA	HUERTO	ESTADO	Muestreo	UBICACIÓN	RT-PCR	ANIDADO	qRT-PCR	PCR IOBANA
A629	ESPERANZA	YUCATÁN	27/01/2012	L14A4	-	-	+	+
A630	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L14A9	-	-	-	-
A631	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L5A7	-	-	+	-
A632	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L2A1	-	+	-	-
A633	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L8A9	-	-	-	-
A634	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L6A8	-	-	-	-
A635	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L14A8	-	-	-	-
A636	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L8A9	-	+	+	-
A637	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L14A8	-	+	-	-
A638	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L8A9	-	-	+	-
A639	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L2A1	-	-	-	-
A640	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L6A8	-	-	-	-
A641	ESPERANZA	YUCATÁN	27/01/2012	L2A11	-	-	-	-
A642	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L2A1	-	-	+	-
A643	CASTAMAY	CAMPECHE	27/01/2012	L8A9	-	-	+	-
A644	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L13A12	-	+	+	+
A645	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L14A4	-	-	+	-
A646	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L14A3	-	-	-	-
A647	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L3A21	-	-	-	-
A648	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L2A19	-	-	+	-
A649	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L6A10	-	-	+	-
A650	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L1A15	-	-	-	-
A651	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L8A14	-	-	+	-
A652	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L10A11	-	-	+	-
A653	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L3A20	-	-	+	-
A654	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L5A2	-	-	+	+
A655	ESPERANZA	YUCATÁN	02/03/2012	L10A12	-	-	-	-
A656	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L2A4	-	-	-	-
A657	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L2A4	-	-	+	-
A658	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L14A8	-	-	+	-
A659	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L14A8	-	-	+	-
A660	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L10A5	-	-	+	-
A661	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L8A9	-	-	-	-
A662	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L14A8	-	-	+	-
A663	CASTAMAY	CAMPECHE	23/03/2012	L8A9	-	-	+	-
C.1	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L2A1	-	-	-	-

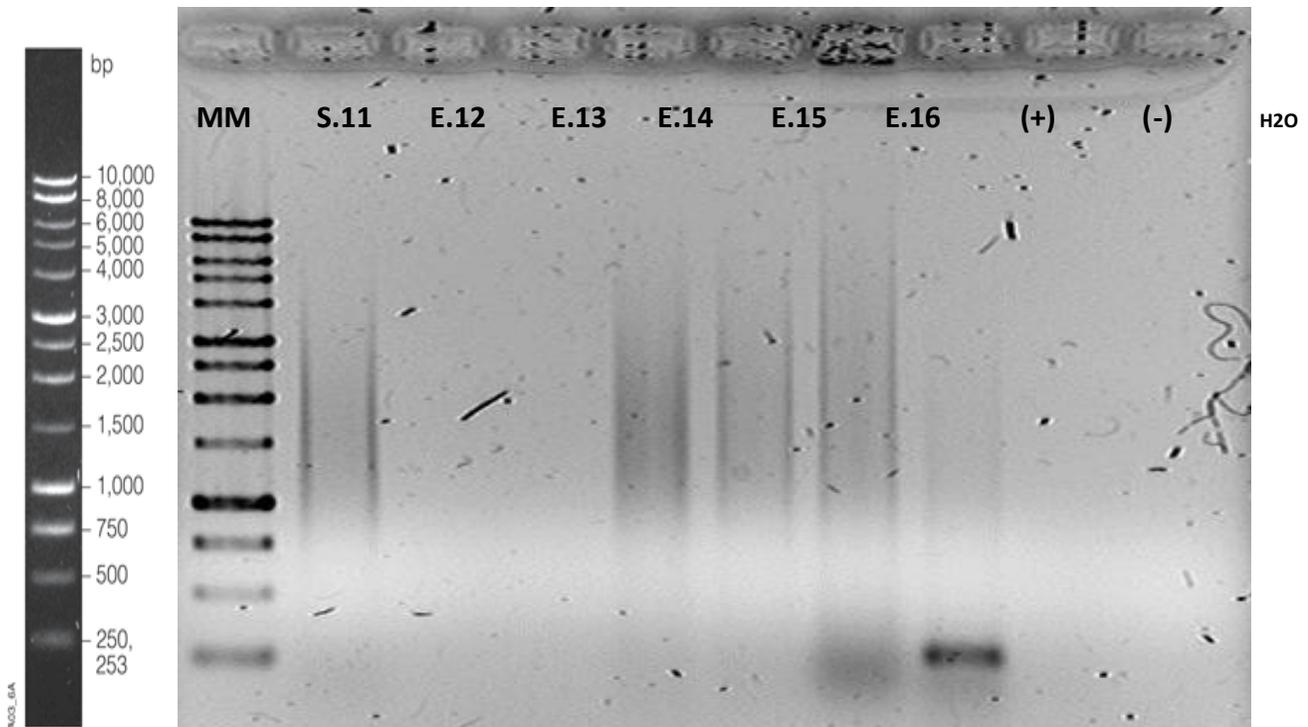
APÉNDICE A.7. Detección de CTV en áfidos por RT-PCR, PCR anidado, qRT-PCR (continuación...)

MUESTRA	HUERTO	ESTADO	Muestreo	UBICACIÓN	RT-PCR	ANIDADO	qRT-PCR	PCR IOBANA
C.2	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L8A9	-	-	+	-
C.3	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L8A9	-	-	-	-
C.4	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L8A9	-	-	+	-
C.5	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L8A9	-	-	+	-
C.6	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L9A1	-	-	+	-
C.7	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L10A6	-	-	+	-
C.8	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L10A6	-	-	+	-
C.9	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L10A6	-	-	-	-
C.10	CASTAMAY	CAMPECHE	19/03/2013	L14A8	-	-	-	-
S.11	SAMAHIL	YUCATÁN	20/03/2013	GEOPOSICIONADO	-	-	+	-
E.12	ESPERANZA	YUCATÁN	15/03/2013	L3A7	-	-	-	-
E.13	ESPERANZA	YUCATÁN	16/03/2013	L4A6	-	-	-	-
E.14	ESPERANZA	YUCATÁN	17/03/2013	L8A3	-	-	-	-
E.15	ESPERANZA	YUCATÁN	18/03/2013	L12A9	-	-	-	-
E.16	ESPERANZA	YUCATÁN	19/03/2013	L13A1	-	-	-	-
E.17	ESPERANZA	YUCATÁN	20/03/2013	L14A8	-	-	+	-

APÉNDICE A.8. Detección de muestras de áfidos positivas al CTV por electroforesis en gel de agarosa.

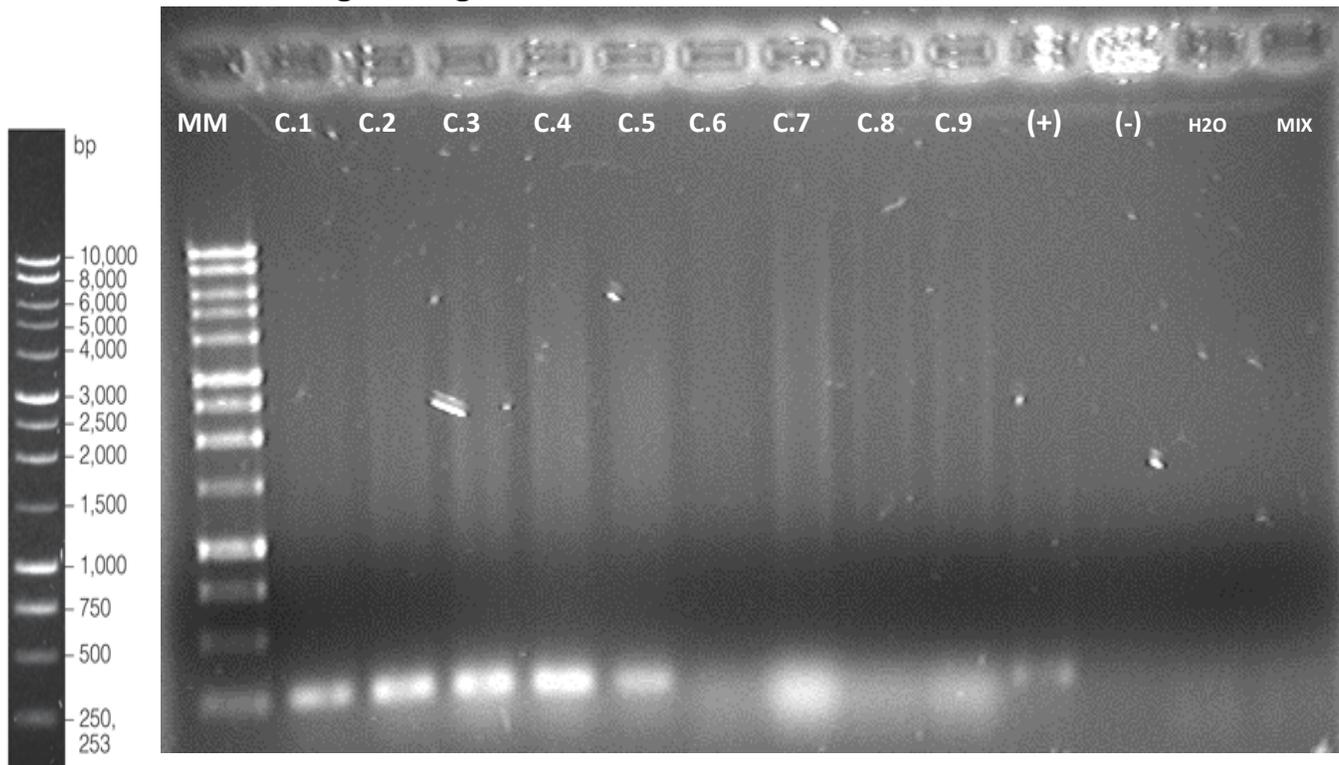


Detección del CTV en muestras de áfidos por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. MW= 1000 pb (Promega).

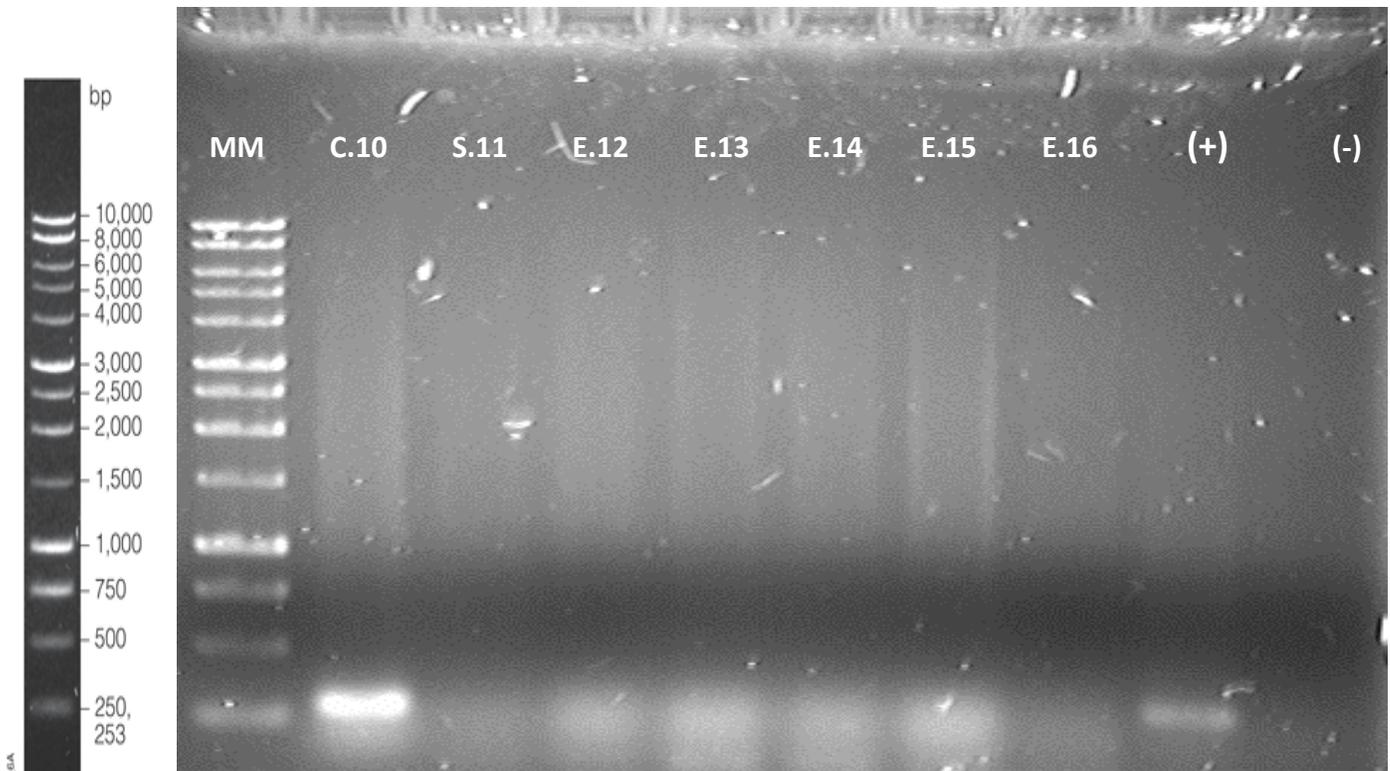


Detección del CTV en muestras de áfidos por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. MW= 1000 pb (Promega).

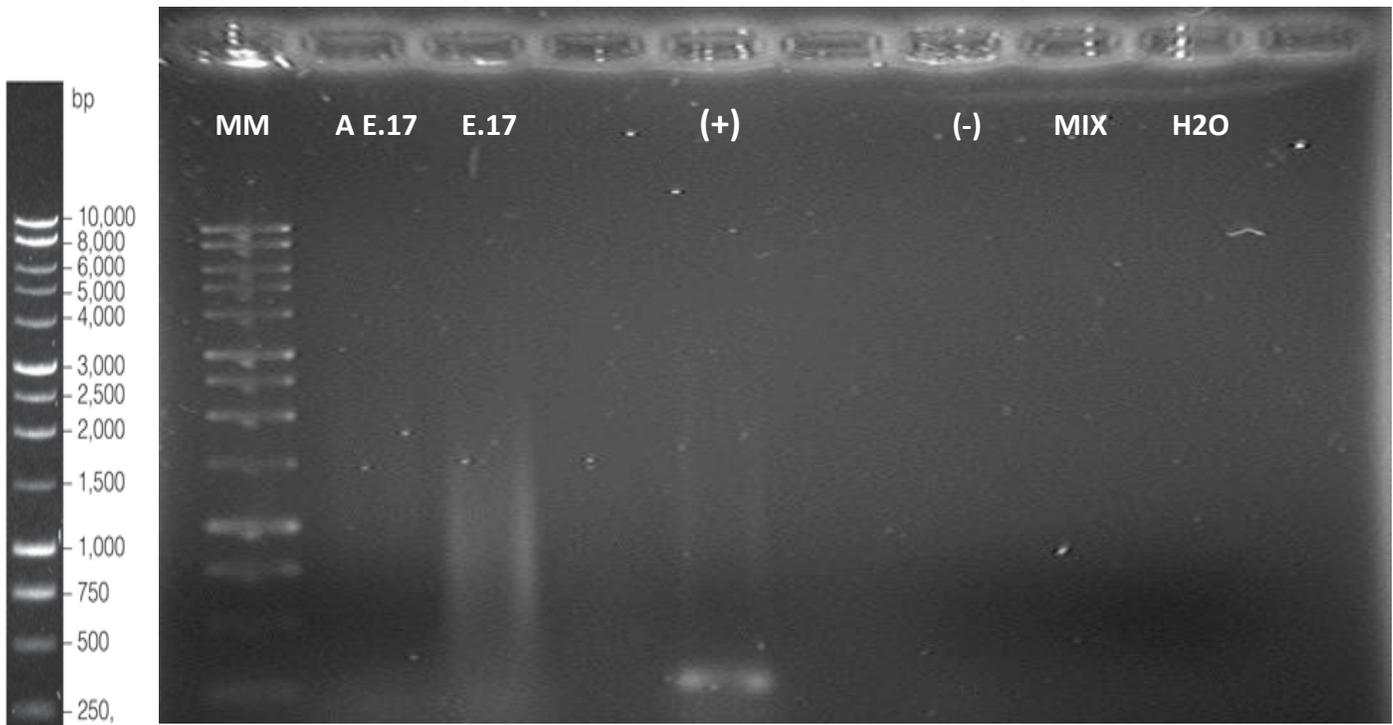
APÉNDICE A.9. Detección de muestras de brotes positivos al CTV por electroforesis en gel de agarosa.



Detección del CTV en muestras de brote por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. MW= 1000 pb (Promega).



Detección del CTV en muestras de brote por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. MW= 1000 pb (Promega).



Detección del CTV en muestras de brote y áfido por PCR anidado. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de amplicones obtenidos con iniciadores CPK-F y CPK-R (280 pb). Controles positivos obtenidos de tejido vegetal de *C. sinensis* con condición histórica positiva, validado por inmunopresión-Elisa. Controles negativos agua y *C. sinensis* negativo validado por inmunopresión-Elisa. MW= 1000 pb (Promega). AE. 17 muestra de áfido. E 17 muestra de brote.

APÉNDICE A.10. Secuencias obtenidas de muestras de áfidos y brotes positivos al CTV.

MUESTRA	ENTIDAD Y HUERTO	TIPO DE TEJIDO	SECUENCIA	IDENTIDAD NCBI Nucleótidos %	AISLAMIENTO	REFERENCIA
GAC625	Campeche, Castamay	Áfido	CCCTCGCTTTTTCAACAATCT GTTCTTTAGCTTGTATGTACA CAGCACATTCTAAATCAGTCA AGCCAGCTCCGGTCAAGAAA TCTGCACACAAAATAATGATAC CCAGCCGGAATCCCTGCATC TAGCGGACGTCCGCCATAAC TCAAATTGCGGTTCTGTCTAC AAAAGGCTAAGTACAGAGCAT TCATGGCCCCA	169/170 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25.	Phytopathology 99 (11), 1297- 1306 (2009)
			184/186 (99%)	CTV aislamiento T30	PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)	
			184/186 (99%)	CTV aislamiento Yucatán 2000	Virol. J. 6, 116 (2009)	
GAC636	Campeche, Castamay	Áfido	GCTTGTATGTACACAGCACAT TCTAAATCAGTCAAACAGCT CCAGTCAAGAAATCCGCACA CAAGTAATGATACCCGGCCG GAATCCCTGCGTCTAGCGGA CGCCCGCCATAACTCAAATTG CGATTCTGTCTGCATTGAGCT GCGT	135/137 (99%)	CTV aislamiento T36	PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)
			135/137 (99%)	CTV aislamiento T308 tipo severo	J. Virol. 75 (17), 8054-8062 (2001)	
GAC637	Campeche, Castamay	Áfido	CTTCTTCAATAATTGTTCTTTA GCTTGTATGTACACAGCACAT TCTAAATCAGTCAAACAGCT CCAGTCAAGAAATCCGCACA CAAGTAATGATACCCGGCCG GAATCCCTGCGTCTAGCGGA CGCCCGCCATAACTCAAATAT GCGATTCTGTCTGCAA	158/161 (98%)	CTV aislamiento T36	PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)
			158/161 (98%)	CTV aislamiento T308 tipo severo	J. Virol. 75 (17), 8054-8062 (2001)	
GAC662	Yucatán, Esperanza 4	Áfido	CTTTTTCAACGAATTGTTCTTT AGCTTGTATGTACACAGCACA TTCTAAATCAGTCAAGCCAGC TCCGGTCAAGAAATCTGCACA CAAATAATGATACCCAGCCG GAATCCCTGCATCTAGCGGA CGTCCGCCATAACTCAAATTG CGTTCTGTCTACAAAAGGCT AAG	169/170 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25.	Phytopathology 99 (11), 1297- 1306 (2009)
			169/170 (99%)	CTV aislamiento T30	PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)	
			169/170 (99%)	CTV aislamiento Yucatán 2000	Virol. J. 6, 116 (2009)	
GVC26	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	ACTCGAAGGGCGTTAGTTCG GTTACCAATACCCTTAGAATT ATACACGATGTCGGTCCAAA GTTTGTGACAGACAAATCTACTT CAACACCCCTCCCGAGTGTAC GTTATGCCGGTGGTGTGCATC ATCACTTTGCAATGATGAACT TTTAACCGTTAATCGGTATAA CATCATAGCTATGTGAAAGTC CTAATCTTTGTGACGCAAGTT AGGATACTTCCCTTTCAGAGC AAGAAATAAGTCCCTGTTCAA AGCAGCATTCTGTTGAGTACT CAACTGACGCACATCGTTCAT CGTTATCAGAGTCGGATCGAT GTGTAAGTTTATGGAACCGAA AGAAGATTGAGCAGCAACAAT TTC	349/356 (98%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25.	Phytopathology 99 (11), 1297- 1306 (2009)
			349/356 (98%)	CTV aislamiento T30	J. Virol. 74 (15), 6856-6865 (2000)	
			348/356 (98%)	CTV aislamiento Yucatán 2000	Virol. J. 6, 116 (2009)	
MUESTRA	ENTIDAD Y	TIPO	SECUENCIA	IDENTIDAD	AISLAMIENTO	REFERENCIA

	HUERTO	DE TEJIDO		NCBI Nucleótidos %		
GVC27	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	TTAGTAACTACAACCTCATCA GCCCCTCGCTTTTCAACAAT TGTTCTTGAGCTTGATGTA CACAGCACATTCTAAATCAGT CAAGCCAGCTCCGGTCAAGA AATCTGCACACAAATAATGAT ACCCAGCCGGAATCCCTGCA TCTAGCGGACGTCCGCCATA ACTCAAATTGCGGTTCTGTCT ACAAAAGGCTAAG	198/199 (99%) 198/199 (99%) 198/199 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
GVC29	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GATTCCGAGCTAACATGCGG TTTCTACCCCAGAGTCTAAG GGCGTTGACAAAGACCCCC CTAATTTCCATAGCTTTGGGT CCCCTTTCCAATCATGATTT TCCTCCCCAAACTCAAAGG GCTTAACTGCATCTAGCGGA CGTCCGCCATAACTCAAATTG CGTTTCTGTCTACAAAAGGCT AAGTAAAGAGCATCGTTAGTC CTACCCAGACTCGAAGGGC GTTAACAAACCCCGGGTATAT TTCCGATAACCCCCCCCCC TGTTTTATGCCCGCGAGAAA AAAGAGACCCACCCCTCGGG GGTTTGGATGGTCTCTCCAG GGGGGAATTAACGCGCGCT TTCTGTGAGAAAGGACCTGT GTAAAACTACCATATTGTAT CCCTGCTTTTTGGGCGGGC ACCCTTTTATTATGCGTTTTT TTAGGGGAGAAGAAAAAAA TATTTTTCTTGTGGGGCGAC CCCATTTGTTGTTTTAAATTAT ATTATTATTAGTGGGGGAG GAAAAAGAGGGAAATTTT TGTAAGATGTCTTCTTGCG TGGGGAGGGGG	100/101 (98%) 100/1001 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)
GVC3	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	CTTTTTCAACAATTGTTCTTTA GCTTGATGTACACAGCAT TCTAAATCAGTCAAGCCAGCT CCGGTCAAGAAATCTGCACA CAAATAATGATACCCAGCCG GAATCCCTGCATCTAGCGGA CGTCCGCCATAACTCAAATTG CGTTCTGTCTACAAAAGGCT AAG	169/169 (100%) 169/169 (100%) 169/169 (100%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
GVC6	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	TTGTTCTTTAGCTTGATGTA CACAGCACATTCTAAATCAGT CAAGCCAGCTCCGGTCAAGA AATCTGCACACAAATAATGAT ACCCAGCCGGAATCCCTGCA TCTAGCGGACGTCCGCCATA ACTCAAATTGCGGTTCTGTCT ACAAAAGGCTAAG	157/157 (100%) 157/157 (100%) 157/157 (100%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
MUESTRA	ENTIDAD Y	TIPO	SECUENCIA	IDENTIDAD	AISLAMIENTO	REFERENCIA

	HUERTO	DE TEJIDO		NCBI Nucleótidos %		
GVC8	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GTTCTTTAGCTTGTATGTACA CAGCACATTCTAAATCAGTCA AGCCAGCTCCGGTCAAGAAA TCTGCACACAAATAATGATAC CCAGCCGGAATCCCTGCATC TAGCGGACGTCGCCATAAC TCAAATTGCGTTCTGTCTAC AAAAGGC	151/151 (100%) 151/151 (100%) 151/151 (100%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
GVC13	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GTATGTACACAGCACATTCTA AATCAGTCAAGCCAGCTCCG GTCAAGAAATCTGCACACAAA TAATGATTCCCAGCCGGAATC CTTGATCTAGC	93/95 (98%) 93/95 (98%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J PLoS ONE 2 (9), E917 (2007)
GVC15	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GCTTTTTCAACAATTGTTCTTT AGCTTGATGTACACAGCACA TTCTAAATCAGTCAAGCCAGC TCCGGTCAAGAAATCTGCACA CAAATAATGATACCCAGCCG GAATCCCTGCATCTAGCGGA CGTCCGCATAACTCAAATTG CGGTTCTGTCTACAAAAGGCT AAGTA	172/172 (100%) 172/172 (100%) 172/172 (100%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
GVC19	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	TGTTCTTTAGCTTGTATGTAC ACAGCACATTCTAAATCAGTC AAGCCAGCTCCGGTCAAGAA ATCTGCACACAAATAATGATA CCCAGCCGGAATCCCTGCAT CTAGCGGACGTCGCCTATA ACTCAAATTGCGGTTCTGTCT ACAAAAGGCT	152/153 (99%) 152/153 (99%) 152/153 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
GVY9	Yucatán, Esperanza 4	Tejido vegetal	CGCTTTTTCAACAATTGTTCTT TAGCTTGATGTACACAGCAC ATTCTAAATCAGTCAAGCCAG CTCCGGTCAAGAAATCTGCA CACAAATAATGATACCCAGCC GGAATCCCTGCATCTAGC	123/123 (100%) 123/123 (100%) 123/123 (100%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)

MUESTRA	ENTIDAD Y HUERTO	TIPO DE TEJIDO	SECUENCIA	IDENTIDAD NCBI Nucleótidos %	AISLAMIENTO	REFERENCIA
C.1	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GCTCTTTACTTAGCCTTTTGT AGACAGAACCGCAATTTGAGT TATGGCGGACGTCCGCTAGA TGCAGGGATTCCGGCTGGGT ATCATTATTTGTGTGCAGATT TCTTGACCGGAGCTGGCTTG ACTGATTTAGATTGTGCTGTG TACATACTAAGCTACAAGAAC AATTGTTGAAAAAGCGAGGG GCTGATGAGGTTGTAGTTACT AA	205/208 (99%) 205/208 (99%) 205/208 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J. Virol. 74 (15), 6856-6865 (2000) Virol. J. 6, 116 (2009)
C.2	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	TACTTAGGCCTTTTGTAGACA GAACCGCAATTTGAGTTATGG CGGACGTCCGCTAGATGCAG GGAANNCGGCTGGGTATCAT TATTTGTGTGCAGATTTCTTG ACCGGAGCTGGCTTGACTGA TTTAGAATGTGCTGTACAT ACTAAGCTAAAGAACAATTGT TGAAAAAGCGAGGGGCTGAT GAGTTGTAGTTA	193/198 (97%) 193/198 (97%) 193/198 (97%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
C.3	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	CTTAGCCTTTTGTAGACAGAA CCGCAATTTGAGTTATGGCG GACGTCCGCTAGATGCAGGG ATTCCGGCTGGGTATCATTAT TTGTGTGCAGATTTCTTGACC GGAGCTGGCTTGACTGATTA GATTGTGCTGTGTACATACAA GCTAAAGAACAATTGTTGAAA AAGCGAGGGGCTGATGAGGT TGATGTA	191/192 (99%) 191/92 (99%) 191/192 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) PLoS ONE 2 (9), E917 (2007) Virol. J. 6, 116 (2009)
C.4	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	GCTCTTTACTTAGCCTTTTGT AGACAGAACCGCAATTTGAGT TATGGCGGACGTCCGCTAGA TGCAGGGATTCCGGCTGGGT ATCATTATTTGTGTGCAGATT TCTTGACCGGAGCTGGCTTG ACTGATTTAGATTGTGCTGTG TACATACTAAGCTAAAGAACA ATTGTTGAAAAAGCGAGGGG CTGATGAGGTTGTAGTTAC	202/204 (99%) 202/204 (99%) 202/204 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J. Virol. 74 (15), 6856-6865 (2000) Virol. J. 6, 116 (2009)
C.5	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	CTCTTTACTTAGCCTTTTGT GACAGAACCGCAATTTGAGTT ATGGCGGACGTCCGCTAGAT GCAGGGATTCCGGCTGGGTA TCATTATTTGTGTGCAGATTT CTTGACCGGAGCTGGCTTGA CTGATTTAGATTGTGCTGTG ACATACTAAGCTAAAGAACA TTGTTGAAAAAGCGAGGGG TGATGAGGTTGTAGTTACT	202/204 (99%) 202/204 (99%) 202/204 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J. Virol. 74 (15), 6856-6865 (2000) Virol. J. 6, 116 (2009)

MUESTRA	ENTIDAD Y HUERTO	TIPO DE TEJIDO	SECUENCIA	IDENTIDAD NCBI Nucleótidos %	AISLAMIENTO	REFERENCIA
C.10	Campeche, Castamay	Tejido vegetal	CTCTTTACTTAGCCTTTTGT GACAGAACCGCAATTTGAGTT ATGGCGGACGTCCGCTAGAT GCAGGGATTCCGGCTGGGTA TCATTATTTGTGTGCAGATT CTTGACCGGAGCTGGCTTGA CTGATTTAGAATGTGCTGTGT ACATACTAAGCTAAAGAACAA TTGTTGAAAAAGCGAGGGGC TGATGAGTTGTAG	198/199 (99%) 198/199 (99%) 198/199 (99%)	CTV aislamiento AT10. Gen capa proteica p25. CTV aislamiento T30 CTV aislamiento Yucatán 2000	Phytopathology 99 (11), 1297-1306 (2009) J. Virol. 74 (15), 6856-6865 (2000) Virol. J. 6, 116 (2009)