



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV): BASES MOLECULARES, BIOLÓGICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS PARA ESTABLECER UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA

SANTIAGO DOMÍNGUEZ MONGE

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2016

La presente tesis titulada: **El virus de la tristeza de los cítricos (CTV): Bases moleculares, biológicas y epidemiológicas para establecer un programa de protección cruzada**, realizada por el alumno: **Santiago Domínguez Monge**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



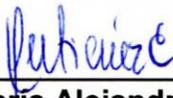
Dr. Gustavo Mora Aguilera

ASESOR



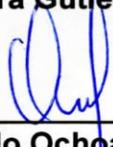
Dr. Emiliano Loeza Kuk

ASESOR



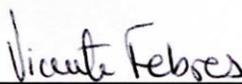
Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa

ASESOR



Dr. Daniel Leobardo Ochoa Martínez

ASESOR



Dr. Vicente José Febres Rodríguez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril de 2016

**EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS (CTV): BASES MOLECULARES,
BIOLÓGICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS PARA ESTABLECER UN PROGRAMA DE
PROTECCIÓN CRUZADA**

Santiago Domínguez Monge, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

RESUMEN

Los aislados reportados del *Citrus Tristeza virus* (CTV) en México son de tipo moderado y al presente no inducen síntomas en cítricos injertados en naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), considerado altamente susceptible, a diferencia de otros países del mundo donde se han reportado aislados severos que inducen síntomas de decaimiento rápido, acanaladuras en corteza y amarillamiento de plántulas. El objetivo general de esta investigación fue la caracterización de 168 aislados de CTV seleccionados por origen regional pertenecientes a la colección *in vivo* del Colegio de Postgraduados (COLPOS) y provenientes de muestreos de campo para determinar la variabilidad genética y patogénica del CTV a 15 años de introducción en México de *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphididae) (Tc), considerado un vector eficiente y selectivo de aislados severos.

Durante invierno de 2013 y 2014, se obtuvieron 104 muestras positivas de 38 huertos de la Península de Yucatán (87 Yucatán; 13, Campeche, y 4 Quintana Roo) con el fin de actualizar la colección del COLPOS consistente en 64 aislados. Se enfatizó esta región por ser el área de ingreso de Tc a México en 2000. Adicionalmente, en 2015 se realizó un muestreo dirigido a un huerto de naranja dulce

(*C. sinensis* (L.) Osbeck) de Veracruz. Para la variabilidad genética se caracterizaron los aislados mediante cuatro genes: ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp), p33, proteína de la cápside (CP), y p13, putativamente asociados con patogenicidad. La extracción de ARN se realizó por el método de CTAB y la RT-PCR por punto final utilizando los primers específicos para cada gen. El estudio de diversidad y filogenia se realizó en dos etapas. En etapa 1, un total de 168 aislados fueron secuenciados con el método de Sanger y analizados con MEGA6 para establecer la estructura poblacional de aislados severos y moderados y la prevalencia regional. Los aislados T30 y T36 se usaron como controles moderados y severos, respectivamente. En etapa 2, se concretó el estudio filogenético con un total de 25 aislados. De estos, 8 aislados (3 aislamientos de Yucatán, 3 de Veracruz y 2 de Tamaulipas) fueron seleccionados a partir de resultados de etapa 1 por su prevalencia y homología de secuencias para comparar su variabilidad con secuencias del GeneBank de 9 aislamientos mexicanos previos al ingreso de Tc. Con fines comparativos se incluyeron las secuencias de 8 aislados de otros países: T30 y T385 (moderados) y T36, VT, SY569, NUagA, NZ-M16 y NZ-B18 (severos). Todos los aislados, excluyendo uno de Veracruz (Mx-Caz-Ver KX029095) fueron de tipo moderado con una homología mayor a 99% para los genes p33, CP y p13. El gen RdRp no generó una clara agrupación de severos y moderados, sugiriendo que no está involucrado con patogenicidad. La diversidad de secuencias del ARN genómico (gRNA) de los 8 aislamientos analizados tuvo un patrón de divergencia similar al observado entre aislados provenientes de un periodo previo a la introducción y dispersión de Tc en México. Estos resultados sugieren que Tc no está aparentemente

induciendo cambios en la estructura poblacional de CTV hacia una prevalencia de variantes severas en México.

Para la caracterización biológica se seleccionaron 7 aislamientos mexicanos (Yucatán 3, Veracruz 2 y Tamaulipas 2) representativos del grupo filogenético moderado con la mayor prevalencia regional. Cada aislamiento fue inoculado por medio de injerto (2-3 yemas) en plantas de 12 meses de edad de limón mexicano (*C. aurantifolia* Swing), naranjo agrio, toronja "Duncan" (*C. paradisi* Macfad.) y naranja dulce (*C. sinensis*) sobre naranjo agrio. Un total de 84 plantas fueron mantenidas a temperaturas de 18 a 24 °C durante 12 meses en el invernadero de la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV-SENASICA). Todas las plantas fueron mensualmente evaluadas por seis meses a partir del segundo mes después de la inoculación para la detección de CTV mediante PCR en tiempo real y para el tipo e intensidad de síntomas (reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos, reducción de unidades clorofila, amarillamiento, aclaramiento de nervadura, acucharado de hoja y picado de tallo). T1-Yuc y T2-Yuc 2 no indujeron ningún tipo de síntoma, excepto un débil acucharado en limón mexicano. Las plantas de naranjo agrio, naranja dulce sobre naranjo agrio y toronja infectadas con los aislamientos T7-Ver, T4-Ver y T4-Ver, respectivamente, tuvieron reducción del crecimiento de 7.7 cm, 13.9 cm y 6,6 cm ($P \leq 0.05$) y también presentaron acortamiento de entrenudos de hasta 2 cm para naranja dulce sobre agrio con T4-Ver ($P \leq 0.05$). En limón mexicano T4- Ver y T6-Tams indujeron síntomas de acucharado de hoja y aclaramiento de nervaduras, pero en todos los casos dentro de un rango de severidad débil (1) a moderado (2), según una escala arbitraria de 0 (sana) a 3. No se observó la

presencia de picado de tallo en las diferentes plantas indicadoras. En ninguna especie indicadora hubo diferencias en la reducción de las unidades clorofila medidas con el equipo SPAD 502 plus ($P \leq 0.05$). Este estudio soporta la viabilidad de algunos de estos aislamientos, seleccionados regionalmente, para un programa de protección cruzada en México, en particular en la combinación naranjo dulce sobre naranjo agrio.

Finalmente, con las variantes de secuencia obtenidas de los 168 aislamientos, los cuales conformaron 5 haplotipos, se desarrolló un modelo para simular la aparición de nuevos haplotipos de CTV para la Península de Yucatán, región endémica con Tc. El modelo se complementó con datos de 18 huertas (16 Yucatán y 2 Campeche) con antecedentes de la enfermedad usando variables del sistema epidemiológico (% de incidencia, edad de huerto, superficie, densidad de plantación, brotes maduros y tiernos, infestación del vector, tipo de riego y temperatura mínima en meses de brotación vegetativa). La predicción del modelo fue obtenida a través de la examinación del coeficiente de correlación de Pearson y por regresión múltiple con el método de Ridge. La selección del modelo fue basada en la proporción de varianza explicada, gráficos de residuos y del factor de inflación de varianza. El modelo ($R^2=0.94$) fue adaptado en MS-Excel al método de simulación Monte Carlo con 5000 iteraciones. En una proyección de 10 años se estimó un total de 11 haplotipos de CTV en el rango de moderados, 6 adicionales a los actualmente presentes en la Península de Yucatán. Estos resultados sugieren una aparente estabilidad de estructura poblacional del CTV en México y el reducido efecto de Tc.

Este estudio demuestra que el vector Tc, bajo vigilancia epidemiológica en México, no ha tenido un fuerte efecto en la dispersión de aislados severos. Sin

embargo, la estructura poblacional puede ser alterada a partir de un eventual incremento de aislados severos introducidos por vía vegetativa u otros medios, incluyendo Tc u otros vectores. La alta prevalencia natural de aislados moderados sugiere que la protección cruzada podría ser una alternativa para el manejo de la enfermedad.

Palabras claves: *Citrus tristeza virus*, epidemiología molecular, diversidad genética, indexado biológico, patogenicidad, modelaje.

**CITRUS TRISTEZA VIRUS (CTV): MOLECULAR, BIOLOGICAL AND
EPIDEMIOLOGICAL BASES TO ESTABLISH A CROSS PROTECTION PROGRAM**

Santiago Domínguez Monge, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2016

ABSTRACT

In Mexico, the reported CTV isolates are of moderate type and exempt of visual symptoms even on citrus propagated on sour orange plants (*Citrus aurantium* L.), considered highly susceptible, unlike other countries where severe isolates had been reported causing symptoms of quick decline, ribbed wood and yellowing of seedling. The overall aim of this research was the characterization of 168 isolates selected by regional origin from the collection *in vivo* of the Colegio de Postgraduados and field sampling to determine the genetic and pathogenic variability of CTV after 15 years of *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphididae) (Tc) introduction to the country, considered the most efficient vector and selective of severe isolates.

During the winter of 2013 and 2014, 104 positive samples from 38 orchards in the Peninsula of Yucatan were obtained (87 in Yucatán, 13 and 4 in Campeche and Quintana Roo, respectively) in order to update the COLPOS collection of 64 isolates. This region was emphasized by being the entry area of Tc in Mexico in 2000. Additionally, in 2015 directed sampling in a sweet orange orchard (*C. sinensis* (L.) Osbeck) of Veracruz was performed. The genetic variability of CTV was characterized using four genes: RNA polymerase RNA-dependent (RdRp), p33, capsid protein (CP) and p13, putatively associated with pathogenicity. RNA extraction by CTAB method and RT-PCR was performed by endpoint PCR using primers specific for each gene. The

diversity and phylogeny study was conducted in two stages. In Stage 1, a total of 168 isolates were sequenced with the Sanger method and analyzed with MEGA6 to establish the population structure of severe and moderate isolates and their regional prevalence. T30 and T36 isolates were used as moderate and severe controls, respectively. In Stage 2, a total of 25 isolates were used. Of these, 8 isolates (3 isolates Yucatan 3 of Veracruz and 2 of Tamaulipas) were selected from the step 1 by prevalence and homology to compare variability with sequences of GenBank of 9 Mexican isolates prior to the entry of Tc. Sequences of other countries isolates were included: T30 and T385 (moderate) and T36, VT, SY569, NUagA, NZ-NZ-B18 and M16 (severe). All isolates, excluding one of Veracruz (Caz-Ver) were moderate with a homology greater than 99% for p33, CP and p13 genes. The RdRp gene had no clear grouping of severe and moderate, suggesting that is not involved with pathogenicity. The diversity of genomic RNA sequences (gRNA) of the 8 isolates analyzed had a pattern similar to that observed among isolates prior to the entrance of Tc in the country. These results suggest that Tc is not apparently inducing changes in the CTV population structure to a prevalence of severe strains in Mexico.

For biological characterization, 7 Mexican isolates (3 of Yucatan, 2 of Veracruz and 2 of Tamaulipas) were selected from the moderate phylogenetic group with highest regional prevalence. Each isolate was inoculated by grafting (2-3 buds) in plants of 12 moth age of Mexican lime (*C. aurantifolia* Swing), sour orange, grapefruit "Duncan" (*C. paradisi* Macfad.), and sweet orange (*C. sinensis*) on orange sour. A total of 84 plants were kept at 18 to 24°C for 12 months under greenhouse at the Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV-SENASICA). During six months, all

plants were monthly evaluated starting from the second month after inoculation, for CTV detection by real-time PCR and for type and symptoms intensity (reduced growth, shortening, chlorophyll reduction units, yellowing, rib clearance, leaf cupping and stem pitting). T1-Yuc y T2-Yuc do not induced any type of symptoms except a weak leaf curling in Mexican lime. Plants of sour orange, sweet orange on sour orange and grapefruit infected with T7-Ver, T4-Ver and T4-Ver isolates, respectively, had reduced growth of 7.7, 13.9 and 6.6 cm ($P \leq 0.05$) and also presented internode shortening of up to 2 cm in sweet orange on orange sour ($P \leq 0.05$). T4-Ver and T6-Tams induced in Mexican lime leaf curling and ribs symptoms within a range of weak (1) to moderate severity (2) according to arbitrary scale of 0 (healthy) to 3. Not presence of stem pitting in was observed. Also, no differences were found in chlorophyll reduction measured with SPAD 502 Plus ($P \leq 0.05$). This study supports the viability of some isolates, selected regionally, in a cross-protection program in Mexico, in particular for the in sweet orange / sour orange combination.

Finally, with the sequence variants of the 168 isolates obtained, represented in 5 haplotypes, a model for simulation of new CTV haplotypes was developed for the Peninsula of Yucatan, endemic region for TC. The model was enhanced using data from 18 orchards (16 in Yucatan and 2 in Campeche) with disease presence and eight epidemiological variables (% of incidence, orchard age, planting area, planting density, mature and young shoots, vector infestation, irrigation type and minimum temperature during the shooting period). The prediction model was obtained through examination of the Pearson correlation coefficient and multiple regression by Ridge method. The selection of the model was based on the proportion of variance explained, residual plots

and variance inflation factor. The model ($R^2=0.94$) was adapted into MS-Excel to Monte Carlo simulation method with 5000 iterations. A total of 11 moderate haplotypes of CTV were estimated in a 10 years projection, six additional to the current five. These results suggest an apparent stability of the CTV population structure in Mexico, and the reduced effect of Tc.

This study shows that Tc, under official epidemiological surveillance, has not a significant dispersion effect of severe isolates in Mexico. However, the population structure can be altered if severe isolates are introduced through vegetative material or other means, including Tc or other vectors. Natural high prevalence of moderate isolates suggests that cross-protection could be an alternative for disease management.

Keywords: *Citrus tristeza virus*, molecular epidemiology, genetic diversity, biological indexed, pathogenicity, modeling.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por:

- Colegio de Postgraduados.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).
- Proyecto PM09_4002 “Implicaciones Epidemiológicas de la Estructura Molecular del CTV en el Sistema Vector-Planta: Bases Biológicas y Cuantitativas para la aplicación del Principio Erradicativo en México (DGSV).

A mi Consejo Particular: Dr. Gustavo Mora Aguilera, Dr. Emiliano Loeza Kuk, Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa, Dr. Daniel L. Ochoa Martínez y Dr. Vicente Febres.

A mis compañeros del Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria (LANREF) y del Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos (GIIC).

A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal (CESV) de los estados de Yucatán, Campeche y Quintana Roo.

A la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV) de la DGSV en Querétaro.

A los profesores del Programa de Fitopatología.

Este trabajo está dedicado a mi familia

Dailín Desireé Domínguez y Dora María Herrera

Y

A mis padres

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCION GENERAL.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS.....	12
1.1. Importancia económica.....	12
1.2. El cultivo.....	15
2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS.....	16
3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.....	18
3.1. Hospedantes y síntomas.....	20
3.2. El virus de la tristeza de los cítricos.....	23
3.2.1. Organización genómica del CTV.....	23
3.2.2. Expresión genómica del CTV.....	26
3.3. Diagnóstico y caracterización de aislamientos.....	27
3.4. Variabilidad genética.....	30
3.5. Transmisión.....	32
3.6. Control de la enfermedad.....	33
III. IMPLICACIÓN DE <i>Toxoptera citricida</i> EN LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL <i>Citrus</i> <i>tristeza virus</i> EN MÉXICO.....	57
3.1. RESUMEN.....	57
3.2. INTRODUCCIÓN.....	59
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
3.3.1. Aislamientos de CTV y caracterización.....	63
3.3.2. Extracción total de ARN.....	63
3.3.3. Síntesis de ADNc y amplificación por PCR.....	64
3.3.4. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético.....	66
3.4. RESULTADOS.....	67
3.4.1. Caracterización biológica de aislamientos de CTV.....	67
3.4.2. Relaciones filogenéticas entre aislamientos de CTV.....	68
3.4.3. Distancia genética, sustituciones sinónimas y no sinónimas de nucleótidos entre aislamientos de CTV.....	70

3.5. DISCUSIÓN	72
3.6. LITERATURA CITADA	76
IV. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE <i>Citrus</i> <i>tristeza virus</i> PARA SU APLICACIÓN EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO	85
4.1. RESUMEN	85
4.2. INTRODUCCIÓN.....	87
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
4.3.1. Selección de aislamientos de CTV	90
4.3.2. Caracterización molecular de aislamientos del CTV.....	90
4.3.3. Análisis de secuencias	91
4.3.4. Inoculación de las plantas indicadoras.....	91
4.3.5. PCR en tiempo real para detección de CTV.....	93
4.3.6. Evaluación de síntomas	93
4.4. RESULTADOS	94
4.4.1. Caracterización molecular de aislamientos de CTV	94
4.4.2. Caracterización biológica de aislamientos de CTV.....	96
4.4.3. Crecimiento, distancia internodal y contenido de clorofila.	97
4.4.4. Síntomas de acucharado de hoja, aclaramiento de nervaduras, amarillamiento y picado de tallo.....	99
4.5. DISCUSIÓN	101
4.6. LITERATURA CITADA	105
V. DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE HAPLOTIPOS DE <i>Citrus</i> <i>tristeza virus</i> EN LA PENSIÑSULA DE YUCATÁN CON SIMULACIÓN MONTECARLO.....	110
5.1. RESUMEN	110
5.2. INTRODUCCIÓN.....	112
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	113
5.3.1. Análisis de datos	113
5.3.2. Análisis de Correlación de Pearson.....	114
5.3.3. Estimación de parámetros con el método de Mínimos Cuadrados Ordinarios.....	115
5.3.4. Ajuste del modelo de regresión lineal múltiple.....	116
5.3.5. Análisis de varianza	117
5.3.6. Análisis de residuos	117

5.3.7. Detección de multicolinealidad	118
5.3.8. Estimación de Parámetros con Regresión Ridge	118
5.3.9. Simulación Monte Carlo en MS Excel	120
5.4. RESULTADOS	124
5.4.1. Coeficientes de correlación de Pearson	124
5.4.2. Matriz de diagramas de dispersión.....	125
5.4.3. Estimación de parámetros con el método de MCO	126
5.4.4. Análisis de varianza	126
5.4.5. Gráficos de residuos	128
5.4.6. Detección de multicolinearidad.....	130
5.4.7. Regresión Ridge	130
5.4.8. Simulación Monte Carlo en Excel.....	132
5.5. DISCUSIÓN	133
5.6. LITERATURA CITADA	135
VI. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS	138

LISTA DE CUADROS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Cuadro 1. Enfermedades más importantes transmitidas por injerto en el cultivo de los cítricos.	17
Cuadro 2. Marcos de lectura abiertos (ORF) del CTV, gen, producto y función.	25
Cuadro 3. Técnicas moleculares empleadas en la caracterización de aislamientos de CTV.	29

III. IMPLICACIÓN DE *Toxoptera citricida* EN LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL *Citrus tristeza virus* EN MÉXICO

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de RT-PCR de cuatro regiones de ARN genómico de CTV.	65
Cuadro 2. Origen y caracterización biológica de ocho aislamientos mexicanos de CTV. .	68
Cuadro 3. Promedio de la distancia de nucleótidos entre grupos de aislamientos de CTV con respecto a diferentes regiones genómicas.	71

IV. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE *Citrus tristeza virus* PARA SU APLICACIÓN EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO

Cuadro 1. Detección de copias de ARN genómico en hoja de plantas indicadoras infectadas con los diferentes aislamientos de CTV por PCR en tiempo real usando el método de presencia/ausencia.	96
Cuadro 2. Contenido de clorofila (unidad SPAD) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.....	97
Cuadro 3. Longitud promedio del brote (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.....	98
Cuadro 4. Longitud promedio internodal (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.....	99

V. DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE HAPLOTIPOS DE *Citrus tristeza virus* EN LA PENSIÑSULA DE YUCATÁN CON SIMULACIÓN MONTECARLO

Cuadro 1. Matriz multivariada de 18 huertos seleccionados considerando variables de los subsistemas del sistema epidemiológico.	114
Cuadro 2. Ecuaciones de regresión de los modelos lineales.....	117

Cuadro 3. Matriz de correlación de variables dependiente e independientes usada en análisis de regresión para relacionar el número de haplotipos de <i>Citrus tristeza virus</i> en la Península de Yucatán.....	125
Cuadro 4. Estimación de los parámetros de los modelos de regresión.	127
Cuadro 5. Análisis de Varianza de los modelos de regresión.....	128
Cuadro 6. Cálculo del Factor de Inflación de Varianza.....	130
Cuadro 7. Estimación de los parámetros de los modelos de regresión con el método ridge.....	132

LISTA DE FIGURAS

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Figura 1. Situación citrícola mundial de los principales países productores.	12
Figura 2. Producción de la citricultura mexicana por especie	13
Figura 3. Estados citrícolas importantes en producción y superficie.....	14
Figura 4. Distribución geográfica del CTV en el mundo. Créditos: EPPO, 2006.....	19
Figura 5. Síntomas típicos inducidos por CTV.....	22
Figura 6. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de CTV de tejido infectado..	23
Figura 7. Representación gráfica de la organización genómica del ARNg del CTV.....	26
Figura 8. Representación gráfica de la organización genómica del ARNg del CTV y de las estrategias de expresión de las distintos ORFs.	27

III. IMPLICACIÓN DE *Toxoptera citricida* EN LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL *Citrus tristeza virus* EN MÉXICO

Figura 1. Árboles filogenéticos de las regiones genómicas RdRp, p33, CP y p13 para 8 aislamientos de CTV..	69
--	----

IV. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE *Citrus tristeza virus* PARA SU APLICACIÓN EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO

Figura 1. Árbol filogenético de la región genómica CP para 8 aislamientos de CTV.....	95
Figura 2. Valores promedio de síntomas de acucharado de hoja (A) y aclaramiento de nervadura (B) en plantas de limón mexicano.	100

V. DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE HAPLOTIPOS DE *Citrus tristeza virus* EN LA PENSIÑSULA DE YUCATÁN CON SIMULACIÓN MONTECARLO

Figura 1. Matriz de diagramas de dispersión de las variables y covariables usadas en el análisis de regresión para relacionar el número de haplotipos de <i>Citrus tristeza virus</i> en la Península de Yucatán.....	126
Figura 2. Gráficos de residuos para comprobación de supuestos de normalidad y homocedasticidad.	129

Figura 3. Gráfica de relación entre el cuadrado medio del error (mse) y lambda, para selección del mejor valor a usar en modelo ridge.....	131
Figura 4. Número de haplotipos totales de <i>Citrus tristeza virus</i> en cítricos, usando simulación Montecarlo.	133

I. INTRODUCCION GENERAL

El cultivo de los cítricos representa una importante generación de ingresos del sector primario mexicano. México es líder en producción de cítricos, al ocupar el cuarto lugar en importancia a nivel mundial (4.84% del total) detrás de China (25.8%), Brasil (16.29%) y Estados Unidos (9.9%) (FAOSTAT, 2015). Actualmente, la tristeza de los cítricos, sigue siendo una amenaza latente para todas las regiones del país, por el ingreso y establecimiento de *Toxoptera citrida* desde el año 2000 (Michaud y Alvarez-Ramos, 200) y su desplazamiento a nuevas zonas citrícolas.

El *Citrus tristeza virus* (CTV), agente causal de la tristeza de los cítricos, es un virus confinado al floema que se transmite de manera semi-persistente por áfidos (Hemiptera: Aphididae), entre los que se reportan a *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Toxoptera aurantii* y *T. citricida*, este último considerado como el más eficiente transmisor (Loeza-Kuk et al. 2008; Raccah, 1980; Hermoso de Mendoza et al. 1984; Gottwald et al. 1997). Históricamente la tristeza de los cítricos ha sido una de las enfermedades más destructivas de los cítricos, siendo responsable de la muerte de más de 100 millones de árboles durante el siglo pasado (Moreno et al. 2008). En el continente americano se detectó en 1940 en Sudamérica confiriéndosele su nombre actual.

El CTV posee ciertas particularidades ligadas a su estructura e información genómica mismas que dificultan su caracterización y que explican su alta variabilidad. Es uno de los virus fitopatógenos más grandes, su genoma consta de una cadena de RNA sencilla con alta variabilidad en el extremo 5' y bastante conservada en el 3' (Karasev et al. 1995). Esta alta variabilidad en uno de los extremos y la longitud del

virus, dificulta trabajar con líneas puras susceptibles de ser enteramente caracterizadas o secuenciadas, aspectos necesarios en estudios de variabilidad. Adicionalmente, por la estrategia de replicación del virus, es frecuente que en aislamientos “purificados” mediante la transmisión secuenciada en diferentes hospedantes y/o purificación por áfidos, persistan RNA subgenómicos (sgRNA) y defectivos (dRNA) que pueden modificar la expresión de síntomas (Ballester-Olmos et al. 1993). Debido al comportamiento replicativo y la perenilidad de los hospedantes, la infección natural del CTV se presenta como mezclas de variantes genómicas, las cuales se presentan en árboles expuestos a reinfestación constante de áfidos (Grant and Higgins, 1956; Powell, et al. 1992; Moreno et al. 1993; Loeza-Kuk et al. 2008; Rivas-Valencia et al. 2010). Se ha observado que árboles pueden presentar una apariencia asintomática, pero al separar los aislamientos mezclados por injerto y/o áfidos (p.e. *A. gossypii*) se pueden obtener aislamientos en baja frecuencia que inducen síntomas severos (Ballester-Olmos et al. 1993; Broadbent et al. 1996). Esto sugiere que un “cóctel” de aislamientos moderados puede operar supresivamente sobre aislamientos severos actuando a manera de una *protección cruzada*. En forma natural esto fue reportado en Brasil (Muller y Costa, 1977).

Existen diferentes métodos de identificación del CTV. Entre estos están los serológicos, ampliamente empleados en diagnósticos masivos, fáciles y económicos, pero restrictivos por la reducida disponibilidad de anticuerpos capaces de diferenciar aislamientos por atributos patogénicos (Permar et al. 1990; Nikolaeva et al. 1998). Adicionalmente, solo se han desarrollado para una porción antigénica del genoma, generalmente la capa proteica. Las técnicas moleculares como la retrotranscripción-

reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de punto final y tiempo real son otras opciones, mediante la cual con un conjunto de iniciadores es posible diferenciar de manera rápida aislamientos del virus (Ayllón et al. 2001; Herrera-Isidrón et al. 2009; Rivas-Valencia et al. 2010). La hibridación con sondas, puede caracterizar aislamientos presentes en árboles o áfidos rápidamente, sin necesidad de realizar la extracción del RNA viral (Narvárez et al. 2000), sin embargo, su precisión y exactitud se ve comprometida a bajas concentraciones del virus. Estas técnicas también se han empleado exitosamente para estudios de diversidad poblacional del CTV (Sambade et al. 2002; Ayllón et al. 2001; Rubio et al. 2001) y en estudios estructurales epidemiológicos en planta y vector (Rivas-Valencia et al. 2008; Loeza-Kuk et al. 2008; Rivas-Valencia et al. 2010; Domínguez-Monge et al. 2014), ampliando la aplicación del diagnóstico a estudios epidemiológicos mecanísticos tendientes a explicar y prevenir cambios de intensidad epidémica.

A nivel nacional se han realizado algunos trabajos relacionados con la epidemiología y caracterización molecular del CTV (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia, 2008; Ruíz-García, 2008; Mora-Aguilera et al. 2005; Góngora-Canúl, 2004; Loeza-Kuk 2003; Mora-Aguilera et al. 2003; Palacios, 2001). Estos trabajos indican la presencia de variantes de tipo severo en algunas regiones como Tamaulipas y Baja California. Sin embargo, esencialmente ha predominado la detección del aislamiento T-30 ampliamente distribuido en los estados con producción citrícola y con árboles positivos asintomáticos (Silva-Vara et al. 2001; Nava et al. 2001; Loeza-Kuk, 2003; Loeza-Kuk et al. 2002; Herrera-Isidrón et al. 2001). El aislamiento T-30 se ha catalogado como no severo o moderado, pues no induce síntomas en *C. aurantifolia* durante la

caracterización biológica. Estudios actuales en el sistema planta-vector muestran la ocurrencia de cambios estructurales de frecuencia de haplotipos pero dentro del espectro de aislamientos de tipo moderado aun en el escenario epidémico donde *T. citricida* (Tc) está presente (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia, 2008; Domínguez-Monge et al. 2014).

La hipótesis general de este trabajo fue que el análisis molecular y biológico de la estructura poblacional de aislamientos del CTV, permitirá evidenciar cambios debido a la presencia de Tc dentro del ámbito de aislamientos de tipo moderado y aportarán bases epidemiológicas para el empleo de aislamientos moderados de alta prevalencia regional para la inducción de protección cruzada. Antecedentes en Brasil y Sudáfrica en el uso de la protección cruzada soportan esta hipótesis pero la adición de del componente de análisis estructural de población coadyuvará a una mejor comprensión y estabilidad de esta estrategia de control (Folimonova, 2013; Souza et al. 2002; Van Vuuren et al. 1993).

En este sentido, los objetivos planteados fueron los siguientes:

- i) Caracterizar la estructura poblacional de aislamientos de CTV.
- ii) Detectar cambios en la diversidad genética del CTV derivado de la ocurrencia y dispersión de Tc.
- iii) Evaluar el comportamiento patogénico a nivel biológico a partir de la estructura poblacional de aislamientos de CTV.
- iv) Desarrollar un modelo de simulación de cambios de frecuencia de haplotipos a nivel regional basado en variables inductivas de los subsistemas del sistema epidemiológico.

Con los objetivos de esta investigación se pretendió enriquecer y sustentar la aplicación de métodos de predicción y manejo de la tristeza de los cítricos en las condiciones particulares de las regiones citrícolas estudiadas de México.

LITERATURA CITADA

- Ayllón, M.A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S.M., Guerri, J., Flores, R., & Moreno, P. (2001). Polymorphism of the 5' terminal region of citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology*, 146, 27-40.
- Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L. (1993). Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42, 219-229.
- Broadbent, P., Brlansky, R.H., & Indsto, J. (1996). Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease*, 80, 329-333.
- Domínguez-Monge, S., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Ochoa-Martínez, D., Febres, V.J., Hernández-Nava, G., & Martínez-Bustamante, V. (2014). Epidemiología molecular de aislamientos de *citrus tristeza virus* de la Península de Yucatán. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32, 46.
- Folimonova, S.Y. (2013). Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Frontiers in microbiology*, 4, 76.
- Góngora, K.C. (2004). Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis MC COLPOS. Montecillo, Méx. pp. 145.

- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M., & Borbon, J. (1997). Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits*, 52, 397-404.
- Grant, T.J., & Higgins, R.P. (1956). Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology*, 47, 272-276.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F. & Pina, L.J.A. (1984). Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, aphididae) in Spain. Proceedings of the 9th International Conference Organ Citrus Virology, IOCV. Riverside, pp. 23-27.
- 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.
- Loeza Kuk, E. (2008). Transmisibilidad de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados por genes del CTV. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 103.
- Loeza, K.E. (2003). Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 85.
- Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Álvarez-Ramos, R., Gutiérrez-Espinosa, A. & Ochoa-Martínez, D.L. (2002). Estudio de dispersión espacio temporal de la tristeza de los cítricos: bases biológicas para su erradicación. XXIX Congreso Internacional

- de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Monterrey, Nuevo León. Del 2 al 5 de Julio.
- Loeza-Kuk, E., Ochoa Martínez, D., Mora-Aguilera, G., Rivas Valencia, P., Gutiérrez-Espinosa A., Cintra de Jesús Junior, W., Villegas-Monter, A., & Arno Wulff, N. (2008). Acquisition of CSDAV and haplotypes of citrus tristeza virus by *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and the implication on citrus sudden death. *Agrociencia*, 42, 669-678.
- Mora-Aguilera, G., Ruíz-García, N., Loeza-Kuk, E., Cisneros, H.J., Rivas-Valencia, P., Álvarez, R., Ochoa, M.D., & Gutiérrez, E.M.A. (2003). Transmisión del Citrus tristeza closterovirus y consideraciones epidemiológicas. pp. 1-21. In: Memorias del VII Simposio Internacional de Citricultura. Retos y Perspectivas. 3-5 abril 2003. Cd. Victoria, Tamaulipas. México.
- Mora-Aguilera, G., Ruíz-García, N., Loeza-Kuk, E., Cisneros-Hernández., J, Rivas-Valencia, P., Álvarez-Ramos, R., Ochoa-Martínez., D.L., Gutiérrez-Espinosa, M.A., & Góngora-Canul, C.C. (2003). Citrus tristeza closterovirus: consideraciones biológicas y epidemiológicas. pp. 1-25. In: Memorias del Curso de Aprobación y Renovación en la Campaña contra el Virus Tristeza de los Cítricos. 8-12 septiembre. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Ver. México.
- Moreno, P., Guerri, Ballester-Olmos, J.F., Albiach, R., & Martínez, M.E. (1993). Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology*, 42, 35-41

- Muller, G.W., y Costa, A.S. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proceedings International Society of Citriculture*, 3, 868-872.
- Narváez, G., Slimane, S.B., Ayllón, M.A., Rubio, L., Guerri, J., & Moreno, P. (2000). A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled. *Journal of Virological Methods*, 85, 83-92.
- Nava-Coronel, M., Silva-Vara, S., Morales-Loredo, A., Febres, V.J., Niblett, C.L., Lee, R.F., & Rocha-Peña, M.A. Caracterización serológica y molecular de algunos aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos de Nuevo León, México.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Garnsey, S.M., & Lee, R.F. (1998). Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Disease*, 82, 1276-1280.
- Palacios, T.E.C. (2001). Transformación genética de pomelo cvs Marsh y Star Ruby (*Citrus paradisi*) y naranjo dulce cv. Valencia (*Citrus sinensis*) con el gen de la capa proteica del Citrus Tristeza Closterovirus. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Méx.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., & Lee, R.F. (1990). A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 80, 224-228.
- Powell, C.A., Pelosi, R.R., & Cohen, M. (1992). Superinfection of orange trees containing mild isolates of citrus tristeza virus with severe Florida isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease*, 76, 141-144.
- Raccah, H.B., Loebenstein, G., & Singer, S. (1980). Aphid transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology*, 70, 89-93.

- Rivas, V.P., Loeza, K.E., Mora, A.G., Ruiz, G.N., Ochoa, M.D., Gutiérrez, E.A., Febres, V. (2010). Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 493-507.
- Rivas-Valencia, P. (2008). Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 131.
- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa, A., Cintra de Jesús Junior, W., Malvas, C., & Arno Wulff, N. (2008). Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil. *Agrociencia*, 42, 85-93.
- Ruíz-García, N. (2008). Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx.
- Ruíz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E., Ochoa-Martínez, D., Ramírez-Valverde, G., Gutiérrez-Espinosa, A., y Alvarez-Ramos, R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo de *Citrus tristeza virus* en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Hortícola*, 15, 41-47.
- Sambade, A., Rubio, L., Garnsey, S.M., Costa, N., Müller, G.W., Peyrou, M., Guerri, J., & Moreno, P. (2002). Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathology*, 51, 257-263.

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

Souza, A.A., Müller, G.W., Targón, M.L.P.N., Takita, M.A., & Machado, M.A. (2002). Stability of the mild protective 'PIAC' isolate of citrus tristeza virus. In: Proceeding of the 15th Conference of IOCV. Riverside, CA. Pp. 131-135.

Van Vuuren, S.P., Collins, R.P., & Da Graca, J.V. (1993). Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease*, 50, 112-116.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. EL CULTIVO DE LOS CÍTRICOS

1.1. Importancia económica

México es líder en producción de cítricos, al ocupar el cuarto lugar en importancia como productor de cítricos a nivel mundial (4.84% del total) detrás de China (25.8%), Brasil (16.29%) y Estados Unidos (9.9%) (FAOSTAT, 2016) (Figura 1).

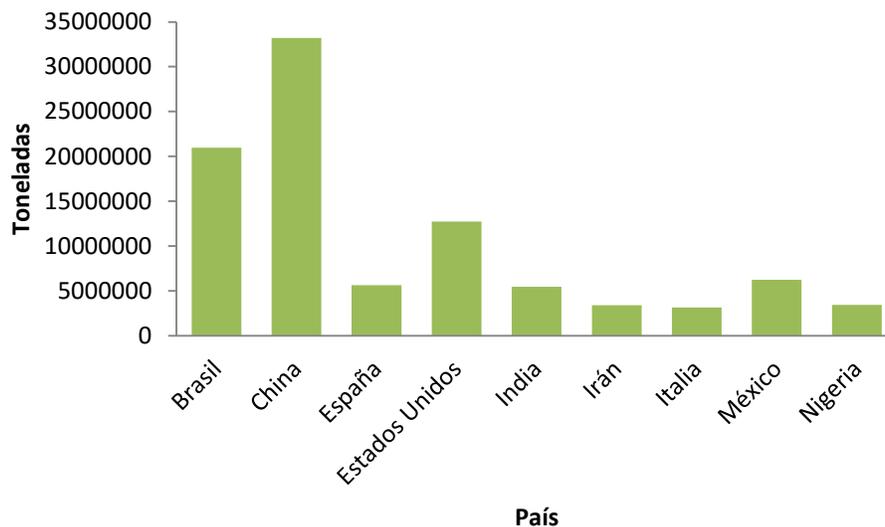


Figura 1. Situación citrícola mundial de los principales países productores (fuente: FAOSTAT, 2016, <http://faostat.fao.org>).

Los cítricos en México constituyen uno de los principales Sistema-Producto de gran importancia económica y social. Se cultivan en poco más de medio millón de hectáreas (565,664 has) en regiones con clima tropical y sub-tropical en 28

entidades federativas. De esa superficie, aproximadamente 67% se destina a los denominados cítricos dulces, cuya producción es de 5.3 millones de toneladas por cosecha, principalmente de naranja (84.6% del total), toronja (7.9%), mandarina (5.5%) y tangerina (3.6%) (SIAP, 2016) (Figura 2).

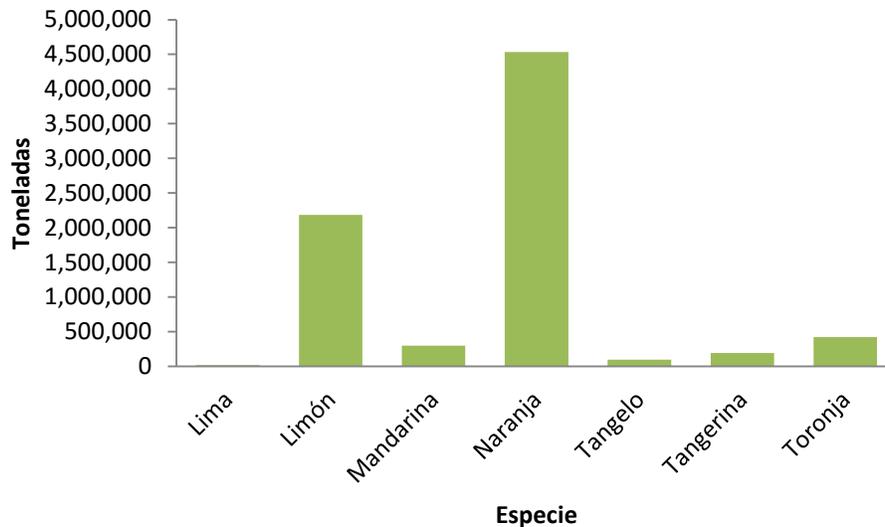


Figura 2. Producción de la citricultura mexicana por especie (fuente: SIAP, 2016, <http://www.siap.gob.mx>)

El cultivo de cítricos dulces constituye un producto agrícola básico en México, representando una fuente importante de empleo y de ingresos en las zonas rurales donde se lleva a cabo. Se estima que cerca de 69 mil familias mexicanas dependen de esta actividad, con un valor superior a siete mil 100 millones de pesos (ASERCA, 2016).

Los estados de mayor importancia en la producción son Veracruz (45.1% del total nacional), Tamaulipas y Michoacán (Figura 3), que en conjunto

representan 54.6% de la superficie sembrada y cosechada, así como San Luis Potosí y Nuevo León (SIAP, 2016) (Figura 3).

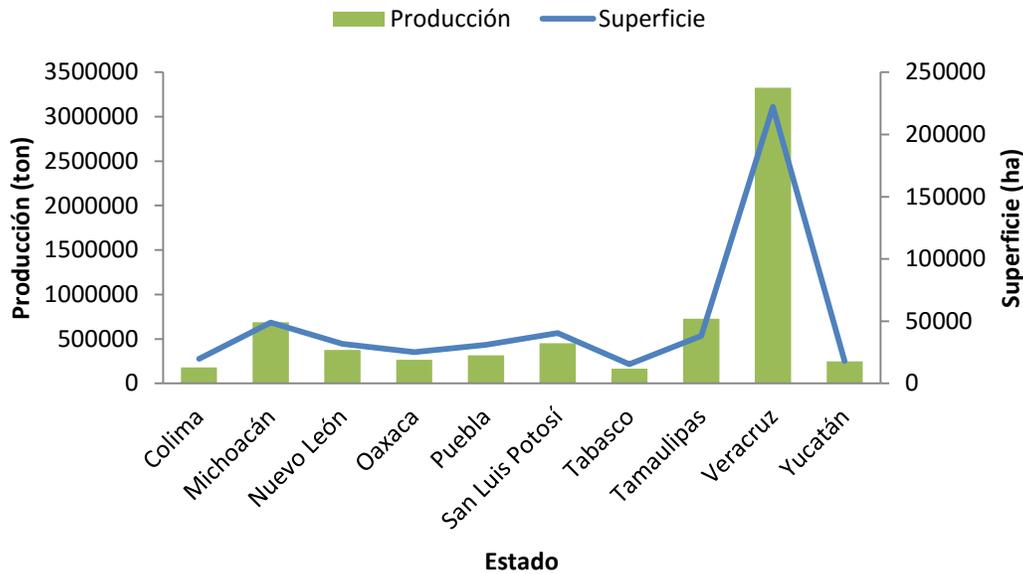


Figura 3. Estados citrícolas importantes en producción y superficie (fuente: SIAP, 2016, <http://www.siap.gob.mx>).

En los últimos años, la producción de cítricos se ha afectado por la ocurrencia de plagas y enfermedades de interés regulatorio para México, entre la que destaca el Huanglongbing (HLB), la cual ha demandado una definición de prioridades de inversión de capital y de recursos humanos así como de logística operativa. Otra enfermedad de importancia es la tristeza de los cítricos causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV), que a pesar de la ocurrencia epidémica de manera asintomática y de aparente baja prevalencia en México, el ingreso de su principal áfido vector *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) desde el año 2000 (Michaud y

Alvares-Ramos, 2000) y su actual establecimiento y dispersión a nuevas zonas cítricas (SENASICA, 2016), demanda una importante necesidad de estudios que permitan la prevención de epidemias de alta intensidad y eventualmente el manejo de la enfermedad.

1.2. El cultivo

La propagación asexual es la técnica más usada en el cultivo de los cítricos a través del injerto de yemas de una variedad seleccionada sobre un patrón de interés a partir de semilla. Las especies utilizadas como patrón mediante semillas son apomícticas (poliembriónicas), bastante vigorosas y que presenta homogeneidad genética, debido a la germinación de embriones nucelares en lugar del embrión cigótico. Por tanto, es preferible la propagación vegetativa para garantizar la homogeneidad genética de las copas. Esta técnica permite seleccionar el patrón más adecuado para las condiciones locales de cultivo, garantizando mayor uniformidad de la plantación y mejor homogeneidad de la producción. No obstante, esta homogeneidad genética del cultivo hace que las plantaciones sean más susceptibles al ataque de patógenos. Así, antes de aparecer por primera vez las epidemias ocasionadas por la gomosis (*Phytophthora spp.*), los cítricos se cultivaban en pie franco. Desde el momento de su aparición empezó a utilizarse como patrón, el naranjo agrio, hasta que se empezó a limitar por la aparición de la tristeza. Actualmente, se dispone de cientos de patrones que presentan resistencia a patógenos diversos y con muy buenas cualidades agronómicas. El citrange Carrizo fue de los primeros patrones tolerantes a la

tristeza que se introdujo con buena calidad de fruta. Sin embargo, más del 90% de las plantaciones cítricas de México están aún establecidas sobre naranjo agrio, una combinación susceptible a la enfermedad debido a la rusticidad del mismo, buena adaptación a condiciones de estrés hídrico y resistencia a gomosis y ciertos nematodos.

2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS

La citricultura representa una actividad de gran importancia económica y social. Sin embargo, los cítricos se ven afectados por diversas enfermedades que causan pérdidas productivas, las cuales pueden ser causadas por hongos, virus, viroides, bacterias, nematodos, procariontes y algas (Timmer et al., 2000; Orosco-Santos, 2001; Varela-Fuentes et al., 2013). Entre las enfermedades que afectan a la citricultura, los agentes patogénicos transmitidos por injerto representan una de las principales causas de pérdidas económicas. Estas enfermedades se caracterizan por que los microorganismos son sistémicos y van asociados al material vegetal. Como ejemplo, se tienen las importaciones que se realizaron en México de material propagativo (semillas, yemas y plantas) de Brasil, España y EEUU en las décadas de 1920 y 1950, donde se introdujeron inadvertidamente los viroides causantes de la cachexia (*Citrus cachexia viroid* (CCaV)) y la exocortis (*Citrus exocortis viroid* (CEVd)), así como los virus de la psorosis (*Citrus psorosis virus* (CPsV)) y la tristeza de los cítricos (SENASICA, 2008). Algunas de ellas se pueden mantener temporalmente en una instalación fitosanitaria, como es el caso de la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal

(ENECUSaV) y, controlar mediante saneamiento y tratamiento profiláctico (NOM-079-FITO-2002), mientras que otras, además de propagarse con el material vegetal, se pueden transmitir mediante insectos vectores, dificultando el control de la enfermedad.

Cuadro 1. Enfermedades más importantes transmitidas por injerto en el cultivo de los cítricos.

Enfermedades	Patógeno	Género	Vectores	Detección en México
Viroides				
Cachexia	<i>Citrus cachexia viroid</i> (CCaV)	<i>Hostuviroid</i>	-	+
Exocortis	<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd)	<i>Pospiviroid</i>	-	+
Virus				
Psorosis	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)	<i>Ophiovirus</i>	?	+
Leprosis	<i>Citrus leprosis virus</i> (CiLV)	<i>Cilervirus</i>	Ácaros	+
Tristeza	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	<i>Closterovirus</i>	Áfidos	+
Muerte súbita	Etiología desconocida/ <i>Citrus suden death-associated virus</i> + CTV?		Desconocido	-
Enanismo del mandarino satsuma	<i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV)	<i>Sadwavirus</i>	?	-
Hoja rasgada	<i>Citrus tatter leaf virus</i> (CTLV)	<i>Capilovirus</i>	-	-
Hoja rugosa	<i>Citrus leaf rugose virus</i> (CiLRV)	<i>Illavirus</i>	-	-
Mosaico amarillo	<i>Citrus yellow mosaic virus</i> (CMBV)	<i>Badnavirus</i>	?	-
Variegación infecciosa	<i>Citrus variegation virus</i> (CVV)	<i>Illavirus</i>	-	-
Bacterias				
Clorosis variegada	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella</i>	Chicharritas	-
Huanglongbing	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	<i>Candidatus Liberibacter</i>	Psilidos	+
Cancro de los cítricos	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	<i>Xanthomonas</i>	-	-
Stubborn	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Spiroplasma</i>	Chicharritas	+

El Cuadro 1 muestra las enfermedades más importantes causadas por viroides, virus y bacterias (Duran-Vila y Moreno, 2000), de las cuales diez se han detectado en México. La tristeza se transmite por injerto y vectores, y es considerada una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de los cítricos (Moreno et al., 2008).

3. LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

El *Citrus tristeza virus* (CTV), agente causal de la tristeza de los cítricos, es un virus confinado al floema que se transmite de manera semi-persistente por áfidos (Hemiptera: Aphididae), entre los que se reportan a *Aphis gossypii*, *A. spiraecola*, *A. craccivora*, *Toxoptera aurantii* y *T. citricida*, este último considerado como el más eficiente transmisor (Loeza-Kuk et al., 2008; Raccah, 1980; Hermoso de Mendoza et al., 1984; Gottwald et al., 1997).

Este virus, actualmente está presente en casi todas las regiones citrícolas del mundo (Figura 4). Históricamente, se considera como una de las enfermedades más importante en el cultivo de los cítricos, la cual ha causado de manera directa e indirecta la muerte de más de 100 millones de árboles (Moreno et al., 2008). Los reportes se remontan a inicios del siglo XIX en plantaciones de naranjo dulce de Sudáfrica en donde causó la muerte de millones de árboles de cítricos establecidos sobre naranjo agrio, el cual sin haberse asociado directamente con un virus, se considera como el primer reporte de daños por la enfermedad tristeza de los cítricos (Weber, 1943). Previo a la identificación del

agente causal de la tristeza de los cítricos, esta enfermedad fue llamada como podredumbre de las raíces o decaimiento rápido (Costa y Grant, 1951). Para 1938 en Ghana se inicia una epidemia en huertos de lima ácida provocada por una enfermedad conocida como “muerte regresiva de las limas” (“lime dieback”) y para 1949 se describe en Sudáfrica el “picado del tallo” (“stem pitting”) (Moreno et al., 1993).

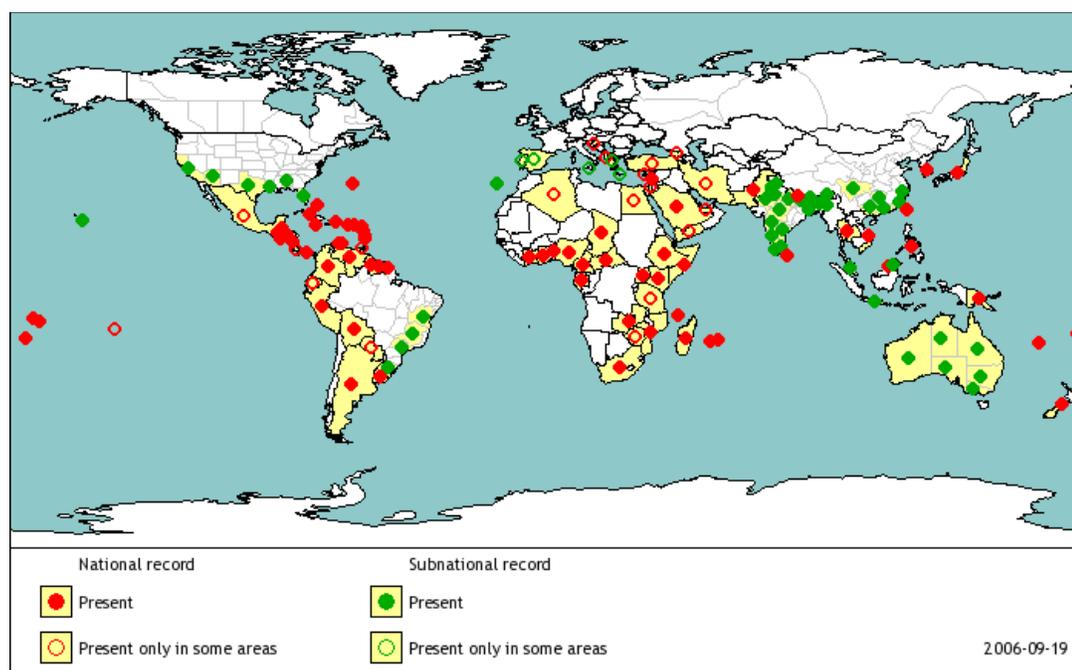


Figura 4. Distribución geográfica del CTV en el mundo. Créditos: EPPO, 2006.

En el continente americano se detectó en Argentina en 1930 y se denominó “podredumbre de las raicillas”; en 1937 se reporta en Brasil con el nombre de “tristeza” por el aspecto de los árboles afectados. En 1939 en el sur de California, se reportó la enfermedad “decaimiento rápido” (“quick decline”). En años posteriores se demostró que todas las alteraciones citadas tenían una causa

común, por lo que se consideraron manifestaciones de una misma enfermedad, prevaleciendo para ésta el nombre brasileño de Tristeza (Moreno et al., 1993; Lee y Rocha-Peña, 1992).

3.1. Hospedantes y síntomas

Los hospedantes naturales del CTV pertenecen a la familia de las Rutáceas, infectando a la mayoría de las especies, variedades e híbridos del género *Citrus* (Muller y Garnsey, 1984); así también, infecta otros géneros de esta familia tales como *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Citropsis*, *Microcitrus* y *Pamburus* (Lee y Bar-Joseph, 2000). Sin embargo, se ha detectado en otros hospedantes que no pertenecen a esta familia, los cuales pertenecen al género *Passiflora* (Müller et al. 1974) y, experimentalmente se ha logrado transmitir a protoplastos de *Nicotiana benthamiana* (Navas-Castillo et al., 1997).

Existen especies que son resistentes o inmunes, tolerantes y altamente susceptibles a la infección de CTV. Algunas especies resistentes a casi todos los aislamientos son los híbridos de la naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) (Barret, 1990; Hearn et al., 1993; Lee y Bar-Joseph, 2000). Algunas tolerantes a los aislamientos que causan el síntoma de picado de tallo son las mandarinas (*C. reticulata*), la lima Rangpur (*C. limonia*), el limón rugoso (*C. jambhiri*) y el limón Volkameriana (*C. volkameriana*). El limón mexicano (*C. aurantifolia*) es susceptible a la mayoría de los aislamientos de CTV (Lee y Bar-Joseph, 2000; Rocha-Peña et al., 1995; Wallace, 1978).

El CTV causa varios síntomas en los hospedantes que infecta, de los cuales dos son considerados de importancia económica. El primer síntoma de importancia económica descrito fue el decaimiento rápido o marchitamiento repentino de árboles de naranja dulce, mandarinas y toronjas injertadas sobre el portainjerto naranjo agrio (Wallace y Fawcett, 1947). En este tipo de síntoma se reconoció al causante de la tristeza como un agente viral. Los árboles con este síntoma producen muchos frutos pequeños, los cuales, al igual que las hojas permanecen adheridos al árbol después de su rápida muerte (Figura 5A). Además también se puede observar una banda café a la altura del punto de injerto (Rocha-Peña et al., 1995). Estos síntomas también han sido descritos para la enfermedad de muerte súbita de los cítricos, recientemente detectada en Brasil, con la diferencia de que ésta está ligada principalmente al portainjerto *C. limonia* y, la muerte de los árboles es más rápida (Román et al., 2003).

El segundo síntoma de importancia económica ocasionado por algunos aislamientos de CTV fue el picado de tallo (Bar-Joseph et al., 1989), el cual puede detectarse al remover la corteza de los árboles de pomelo y naranjo dulce infectados por aislamientos severos (Figura 5C). La severidad de los aislamientos que lo origina se denota cuando incluso los portainjertos reconocidos como tolerantes muestran esta sintomatología (Olson, 1956 y 1958; Rocha-Peña et al., 1995).

Otros síntomas característicos son el amarillamiento de plantas jóvenes (Figura 5E), el cual fue descrito por primera vez en Australia (Wallace y Drake, 1961), el hinchamiento de la unión del injerto (Figura 5B), el aclaramiento de

nervaduras, la deposición de corcho en las hojas (Figura 5E) (Olson, 1956 y 1958) y la pérdida de vigor del árbol (Figura 5D), este último se ha reportado en condiciones de México (GIIC, 2011) pero la caracterización biológica no fue confirmada.

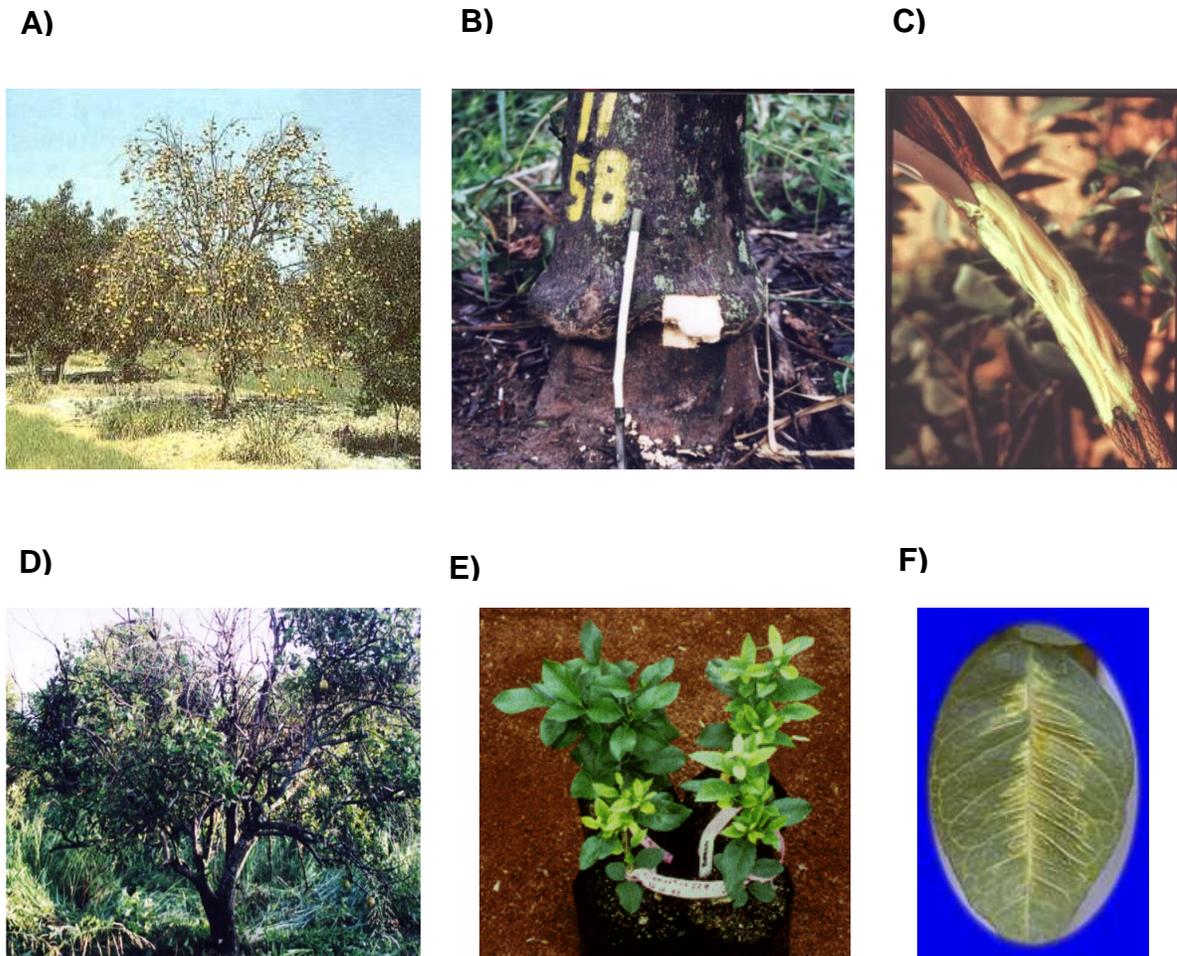


Figura 5. Síntomas típicos inducidos por CTV. A) decaimiento, B) proyecciones en la cara cambial de la madera, C) Acanaladuras en la madera de naranjo dulce causadas por un aislado virulento de CTV, D) Reducción del vigor en naranjo dulce causado por un aislamiento moderado, E) Clorosis (F) Acorchamiento de nervadura. (Fotos G. Mora).

3.2. El virus de la tristeza de los cítricos

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) (familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) (Bar-Joseph et al., 1979), es uno de los virus más grandes de ARN de plantas que se conoce en la naturaleza. Su presencia en las plantas está limitada a los tejidos del floema (Febres et al., 1996; Matthews et al., 1997; Mehta et al., 1997).

3.2.1. Organización genómica del CTV

Las partículas (viriones) del CTV son largas, flexibles y de forma filamentosa que mide 2000 nm de largo por 10 a 12 nm de diámetro, constituido por una molécula de ARN de sentido positivo de 19.3 kb y dos proteínas de la cápside de 25 y 27 kDa que cubren aproximadamente el 95 y 5% del virión respectivamente (Febres et al., 1996; Satyanarayana et al., 2004) (Figura 6).

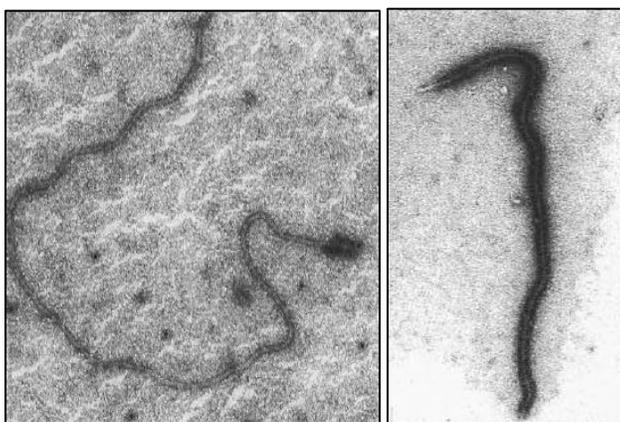


Figura 6. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas de CTV de tejido infectado. A) Partículas de oro localizando los anticuerpos específicos de p27 de una partícula de CTV. B) Decoloración con anticuerpos específicos de la CP de la partícula de CTV. Fotos obtenidas por V. Febres.

El ARN genómico (gARN) del CTV está organizado en 12 marcos de lectura abiertos (ORF) (Figura 7), los cuales pueden codificar al menos 19 proteínas y dos regiones terminales no traducibles (UTR) en los extremos 5' y 3' (Karasev et al., 1995) (Cuadro 2). La región 5' de 107 pb que participa en la unión de los ribosomas para la traducción de la ORF 1, de la que resultaría la replicasa viral necesaria para replicar el gRNA y producir los sgRNA de las ORFs 2 a la 11 para la expresión de las demás proteínas virales. La región 3' UTR de 273 pb que está implicada en el reconocimiento de la RNA polimerasa como ocurre en otros virus de plantas vegetales (Gallie y Kobayashi, 1994). El extremo 3' es el más conservado con más del 97% de similitud entre aislamientos de diferente procedencia, mientras que el extremo 5' su conservación es de 44 % (Karasev et al., 1995; Karasev, 2000; Ayllón et al., 2001; Satyanarayana et al., 2002).

La región codificante del gRNA contiene en la mitad 5' el módulo de replicación (ORFs 1a y 1b) y la mitad 3' un módulo de cinco genes (p6, p65, p61, p27 y p25) que codifican proteínas implicadas en el ensamblaje del virión y el movimiento de célula a célula, que está conservado en todos los miembros de la familia *Closteroviridae* (Figura 7, Cuadro 2).

Cuadro 2. Marcos de lectura abiertos (ORF) del CTV, gen, producto y función (Karasev et al., 1995; Hilf et al., 1995; Navas-Castillo et al., 1997; Ayllón et al., 2006; Bergua et al., 2014; Satyanarayana et al., 2000, 2004; Gowda et al., 2000; Lu et al., 2004; López et al., 2000; Ghorbel et al., 2001; Fagoada et al., 2005).

ORF	Gen	Producto	Función
1a	próximo al extremo 5'	Codifica para una poliproteína de 349 kDa, con cuatro dominios, dos de ellos de proteasas tipo papaína (L-PRO), uno de MET y otro de HEL.	Replicación
1b	RdRp	Se traslapa con ORF 1a y contiene los motivos típicos de la ARN polimerasa dependiente de ARN (POL)	Replicación
2	p33	Proteína de 33 kDa	Proteína que regula la superinfección
3	p6	Proteína hidrofóbica de 6kDa (MP)	Proteína de transporte, se asocia a la membrana del retículo endoplásmico.
4	p65	Homóloga de la proteína de choque térmico, hidrofóbica de 65 kDa (HSP70)	Actúa en el ensamblaje del virión, en el movimiento célula-célula (transmembranal), guiando los viriones cuando se realiza el movimiento a través del plasmodesmo.
5	p61	Proteína hidrofóbica	Ensamblaje del virión
6	p27	Proteína de la cápside menor (CPm)	Ensamblaje del virión
7	p25	Proteína de la cápside (CP)	Encapsida al ARN viral, lo protege de la degradación y actúa como supresor del silenciamiento.
8	p18	Proteína de 18 kDa	Desconocida
9	p13	Proteína de 13 kDa	Desconocida
10	p20	Acumula cuerpos de inclusión amorfos en plantas infectadas	Interfiere con la dispersión sistémica del silenciamiento. Transporte sistémico.
11	p23	Proteína de 23 kDa	Actúa como enlace del ribosoma, regula la acumulación de cadenas positivas de ARN, determinante patogénico y supresor de silenciamiento.

Modificado de Rivas-Valencia et al., 2008.

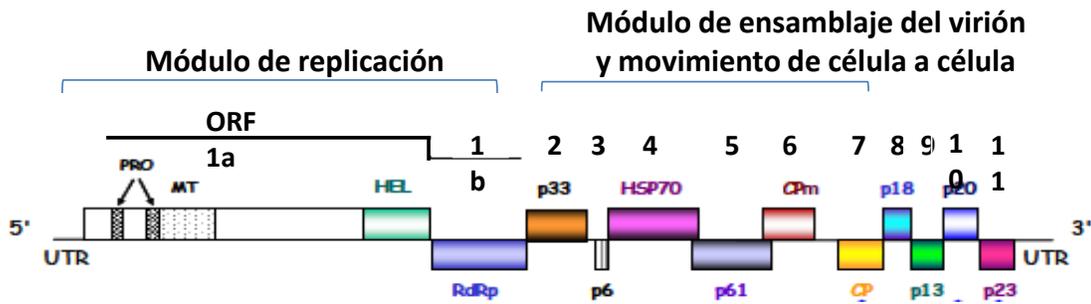


Figura 7. Representación gráfica de la organización genómica del ARN del CTV, los rectángulos a diferente altura indican marcos abiertos de lectura (ORF), las flechas verticales indican puntos de corte de la poli-proteína. P-PRO= Proteínasa tipo papaína, MTR-1= Metiltransferasa. (Basado en: Doljia et al., 1994; Karasev, 2000).

3.2.2. Expresión genómica del CTV

La expresión del genoma de CTV incluye al menos tres mecanismos que son ampliamente utilizados por otros virus de RNA y que son necesarios para multiplicarse e invadir el huésped: procesamiento proteolítico, deriva ribosomal y producción de RNAs subgenómicos 3' co-terminales (Ayllón et al., 2003, 2004; Gowda et al., 2001, 2003; Hilf et al., 1995; Karasev et al., 1995; Satyanarayana et al., 2002) (Figura 8). El ARN del virión es infeccioso y funciona como genoma y como ARN mensajero viral. Los ORF 1a y 1b son producidos por desplazamiento del marco ribosomal (Karasev et al., 1995).

Los otros ORFs (10 genes) del extremo 3' del gran se traducen a partir de la síntesis de un conjunto de ARNs subgenómicos (sgARN) co-terminales (Hilf et al., 1995).

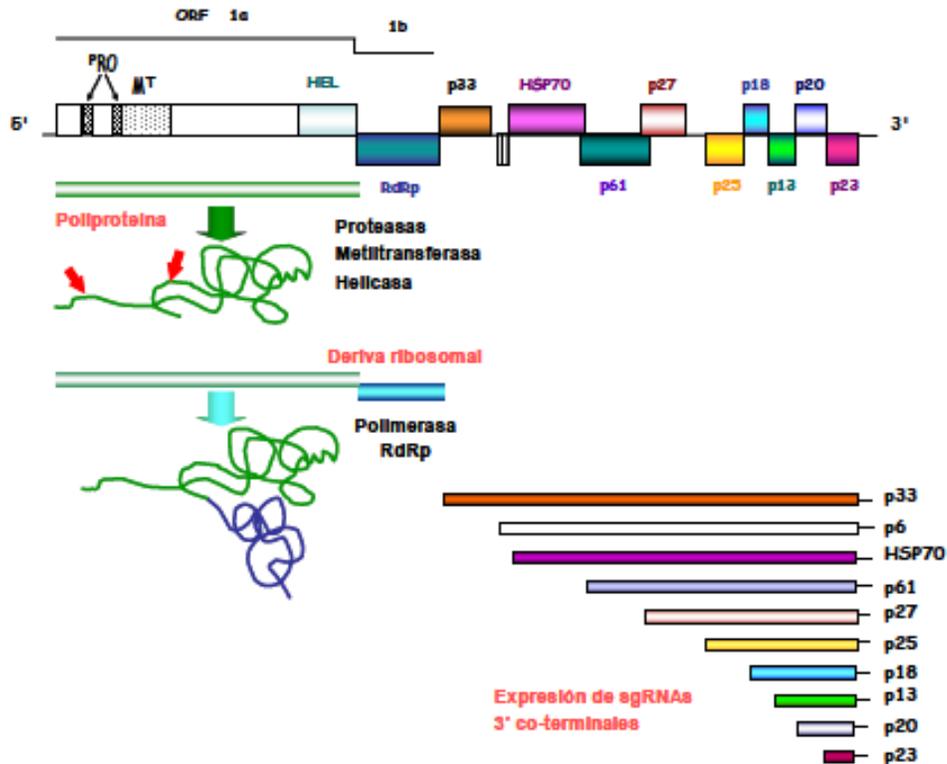


Figura 8. Representación gráfica de la organización genómica del ARNg del CTV y de las estrategias de expresión de las distintos ORFs de los extremos 5' y 3': procesamiento proteolítico, deriva ribosomal y producción de sgRNAs co-terminales.

3.3. Diagnóstico y caracterización de aislamientos

Existen diferentes métodos de identificación del CTV. Entre estos el método más tradicional de diagnóstico es el indexado biológico en invernadero

(Roistacher, 1991, Garnsey et al., 1995), que consiste en la inoculación del virus en plantas indicadoras libres del patógeno, las cuales reaccionan ante la infección del virus, expresando diversos síntomas diferenciales según el aislamiento (Ghorbel et al., 2001).

El método serológico mediante técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos policlonales o monoclonales (Bar-Joseph et al., 1979; Cambra et al., 1991; Garnsey et al., 1993; Gonsalves et al., 1978; Nikolaeva et al., 1998; Permar et al., 1990; Vela et al., 1986; Ruiz-García et al., 2009) se basa en la capacidad de reconocimiento y combinación que tienen los anticuerpos a un antígeno específico (Abbas et al., 1991; Matthews, 1991). Este método ha sido ampliamente usado en diagnósticos masivos, fáciles y económicos, pero restrictivos por la reducida disponibilidad de anticuerpos capaces de diferenciar aislamientos por atributos patogénicos (Permar et al., 1990; Nikolaeva et al., 1998; Ruiz-García et al., 2009). Adicionalmente, solo se han desarrollado para una porción antigénica del genoma, generalmente la capa proteica.

La hibridación con sondas, puede caracterizar aislamientos presentes en muestras de árboles o áfidos rápidamente, sin necesidad de realizar la extracción del RNA viral (Narváez, 2000); sin embargo, su precisión y exactitud se ve comprometida a bajas concentraciones del virus.

Las técnicas bio-moleculares como la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de punto final y tiempo real son otras opciones, mediante la cual con un conjunto de iniciadores es posible diferenciar de manera rápida aislamientos del virus (Ayllón et al., 2001; Loeza-Kuk, 2008).

Todas estas técnicas se han empleado exitosamente para estudios de diversidad poblacional del CTV (Sambade et al., 2002; Ayllón et al., 2001) y en estudios estructurales epidemiológicos en planta y vector (Rivas-Valencia et al., 2008; Loeza-Kuk et al., 2008), ampliando la aplicación del diagnóstico a estudios epidemiológicos mecanísticos tendientes a entender y prevenir cambios de intensidad epidémica.

Cuadro 3. Técnicas moleculares empleadas en la caracterización de aislamientos de CTV.

Técnica molecular	Región Genómica	Aplicación	Cita
Serología	CP	Discriminación de aislamientos	Permar <i>et al.</i> , 1990; Pappu <i>et al.</i> , 1993
Análisis de la doble cadena de ARN	ARN genómico	Diferenciación en el perfil de dsRNA entre aislamientos	Dodds <i>et al.</i> , 1987
Hibridación con sondas	ARN genómico	Diferenciación en el perfil de hibridación con sondas de cDNA o cRNA	Albiach-Martí <i>et al.</i> , 2000; Narváez <i>et al.</i> , 2000
RFLP		análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción obtenidos con distintas endonucleasas	Gillings <i>et al.</i> , 1993; Roy <i>et al.</i> , 2003
RT-PCR	3 regiones no contiguas	Variación genética	Hilf <i>et al.</i> , 2005
SSCP	P18, p13, p20 y p23	Caracterización de la estructura poblacional de aislamientos de CTV	Sambade <i>et al.</i> , 2002
	P20 y A (ORF1a) CP	Variación genética en poblaciones naturales de CTV Caracterización de la estructura poblacional de aislamientos de CTV	d'Urso <i>et al.</i> , 2000, Rivas-Valencia et al 2010
SSCP-Secuenciación	P18 y p20	Variación genética	Ayllón <i>et al.</i> , 2006
Secuenciación	P349, CP, p23 y p13	Diversidad genética	Herrera-Isidró et al. 2009

En general, los estudios sobre caracterización molecular de aislamientos de CTV han utilizado algunos procedimientos rápidos basados en la tecnología de ADN recombinante, como el análisis de doble cadena de ARN, RT-PCR, RFLP's, SSCP, hibridación y secuenciación para caracterizar la variabilidad de CTV e identificar grupos específicos de aislamientos, tratando de asociarlos con las características patogénicas de cada aislamiento (Cuadro 3).

3.4. Variabilidad genética

La diversidad genética es variable en las diferentes regiones que conforman el genoma del CTV, siendo el extremo 3' más conservado, con una identidad entre aislamientos mayor al 95% y el extremo 5' más variable, con valores de identidad en ocasiones inferiores al 50%. El CTV tiene numerosos aislamientos que difieren en características biológicas y genéticas (Moreno et al., 1993; Rubio et al., 2001; Mendoza et al., 2003; Loeza-Kuk, 2003; Herrera-Isidrón et al., 2004; Loeza-Kuk et al., 2005). Los aislamientos pueden ser clasificados en seis genotipos: T3, T30, T36, VT, T68 y RB (Hilf et al., 2005; Folimonova et al., 2010). Esta agrupación es definida como diferentes grupos filogenéticos de acuerdo al análisis de secuencias de nucleótidos del ORF 1a, la sintomatología y el rango de hospedantes que infectan (Hilf et al., 2005; Folimonova et al., 2010; Roy et al., 2013). Esta región del genoma presenta una alta diversidad genética entre variantes de CTV, con niveles de identidad de secuencia de 72.3 a 90.3% (Mawassi et al., 1996; López et al., 1998; Kong et al., 2000; Rubio et al., 2001; Hilf et al., 2005; Roy et al., 2005; Harper et al., 2010). Esto contrasta con un rango de identidad de 89 a 94.8%,

encontrado en las regiones más conservadas del extremo 3' de los genomas de diferentes razas de CTV. Una raza no es una variante homogénea. Cada raza se compone de aislamientos con menor divergencia de secuencias, generalmente menor del 5% a lo largo de todo el genoma (Hilf et al., 2005; Moreno et al., 2008; Harper et al., 2010). Adicionalmente, los aislamientos de una raza pueden tener variaciones significativas en los tipos de síntomas y en la severidad de los mismos. Sorprendentemente, los árboles de campo por lo general contienen poblaciones complejas de CTV, que a menudo están compuestas de mezclas de diferentes genotipos y recombinaciones entre estos genotipos (Grant and Higgins, 1957; López et al., 1998; Kong et al., 2000; Rubio et al., 2001; Vives et al., 2005; Weng et al., 2007; Martín et al., 2009). Esto es entendible por la perenilidad de los cítricos hasta por más de 50 años favoreciendo reinfecciones y cambios de frecuencia de haplotipos (Rivas-Valencia, 2008; Rivas-Valencia et al., 2010).

La variabilidad en la diversidad genética también ha sido reportada entre regiones codificantes, así como dentro de un mismo gen, sugiriendo diferentes presiones de selección en las regiones genómicas del CTV. Por ejemplo, la diversidad genética de aislamientos de ocho estados de México fue de 0.054 para el gen CP, pero de 0.143 para una región de la ORF 1a (Herrera-Isidrón et al., 2009).

Las principales fuentes de variación genética de las poblaciones de CTV en campo son las mutaciones, recombinación de genotipos, selección, deriva genética y flujo génico debido a las reinoculaciones e infección persistente en los árboles de campo (Weng et al. 2007).

3.5. Transmisión

El CTV es un patógeno que puede transmitirse fácilmente por injerto y de manera semipersistente por varias especies de áfidos (Roistacher and Bar-Joseph, 1987; Lee et al., 1994; Yokomi et al., 1994; Moreno et al., 2008; Loeza-Kuk, 2008). Experimentalmente se puede transmitir de forma mecánica y, por la planta parásita del género *Cuscuta*, sin embargo estas dos formas de transmisión carecen de implicación epidemiológica (Garnsey et al., 1977; Lee y Bar-Joseph, 2000). No se ha demostrado la transmisión de CTV por semilla (McClellan, 1957).

La dispersión local (a nivel de planta) es por medio de áfidos. El áfido es virulífero por un tiempo de 24 a 48 horas y no requiere de un período latente. La transmisión requiere de un período de alimentación de 4 a 6 horas. En general, entre más tiempo un áfido se alimenta de una planta con CTV la probabilidad de *adquisición* de partículas virales se incrementa. Similarmente, a mayor tiempo un áfido virulífero se alimenta de una planta sana se incrementa la probabilidad de *transmisión* (Yokomi, 1993). Sin embargo, la eficiencia de la transmisión por áfidos puede ser afectada por la concentración del virus en la planta “donante”, el tipo, edad, y condición de la planta “donadora”, entre otros factores (Yokomi et al., 1994; Roistacher and Bar-Joseph, 1987; Loeza-Kuk et al., 2008).

El vector más eficiente es el áfido *Toxoptera citricida* (Yokomi et al., 1994; Yokomi, 1993; Loeza-Kuk et al., 2008); sin embargo, otras especies de áfidos tienen la habilidad para transmitir el CTV (Roistacher and Bar-Joseph, 1987; Rocha-Peña et al., 1995; Loeza-Kuk et al., 2008). En México, *Toxoptera citricida* fue detectado en febrero del 2000 al norte de los estados de Quintana Roo y Yucatán

(Machaud y Alvarez, 2000), para lo cual se implementó la Campaña contra el “Virus de la Tristeza” con fundamento en la Norma Oficial Mexicana (NOM-031-FITO-2000). Esta Norma fundamentó el muestreo del patógeno y, monitoreo y acciones de control biológico y químico contra este áfido. Actualmente, este insecto se encuentra distribuido en los estados de Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Morelos, Nayarit, Querétaro, San Luis Potosí, Estado de México, Yucatán, Quintana Roo, Veracruz, Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Puebla y Campeche (SENASICA, 2016), lo que sugiere una amenaza importante para la citricultura del litoral del golfo, ya que es la principal zona citrícola y en donde el naranjo agrio sigue siendo predominante. Los estudios CTV-vector son importantes con el fin de entender riesgos epidémicos (Hernández-Nava, 2013).

3.6. Control de la enfermedad

Existen diversas estrategias que se pueden aplicar para controlar los daños ocasionados por el CTV, principalmente bajo el principio de prevención. Sin embargo, para una toma efectiva de decisiones se requiere considerar el nivel de daño (incidencia y severidad) de la tristeza, las frecuencias regionales de los tipos de aislamientos virales, y la combinación injerto/portainjerto predominante en cada zona específica (Garnsey et al., 1987; Garnsey et al., 1998; Mora-Aguilera et al., 2003). Las estrategias tienen como fin prevenir que la condición epidémica de baja endemicidad y asintomática pueda cambiar por la prevalencia y dispersión de alguna raza severa. Entre estas estrategias, están los programas de cuarentena y certificación de material vegetal propagativo, los programas de erradicación de

plantas enfermas y/o de los vectores, el uso de protección cruzada y la resistencia genética. Actualmente, México detuvo la Campaña oficial contra CTV pero mantiene líneas de investigación con propósito de prevención de riesgos. El Tc sin embargo, se mantiene dentro de un Programa de Vigilancia (SENASICA, 2016).

Cuando el CTV aún no se ha establecido en las zonas citrícolas, se pueden aplicar programas de cuarentena y certificación mediante normas que regulen los procesos de material propagativo para evitar la introducción y/o establecimiento del patógeno hacia nuevas zonas (Garnsey et al., 1998; Lee y Bar-Joseph, 2000).

Por otra parte, cuando el virus se ha introducido en una zona citrícola y los niveles de daño son aún bajos o restringidos a cierta área, se puede establecer un programa de eliminación de árboles enfermos que evite o retrase la diseminación y establecimiento de la enfermedad (Gottwald et al., 2002). Programas de este tipo aplicaron por el gobierno en el Noreste de México (Góngora, 2004). Sin embargo, en zonas citrícolas donde la incidencia es alta y la erradicación resulta inviable por la exitosa dispersión y establecimiento del CTV, se pueden utilizar portainjertos tolerantes como *Poncirus trifoliata* y sus híbridos los citranges Troyer y Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), lima Rangpur (*C. limonia* Osb) mandarina Cleopatra (*C. reshni* Hort. ex Tan.) o limón rugoso (*C. volkameriana* Ten. y Pasq.) (Moreno et al., 2008). Sin embargo, esta estrategia resulta de interés en regiones donde predominan los aislamientos de tipo moderado, ya que en presencia de estos, los naranjos dulces, mandarinos y pomelos injertados sobre patrones tolerantes, y en México sobre naranjo agrio, considerado susceptible, permanecen asintomáticos.

Sin embargo, cuando los aislamientos severos de CTV están ampliamente distribuidos en las áreas citrícolas, se requiere el uso de resistencia al virus o la implementación de un programa de protección cruzada con aislamientos débiles del mismo virus que impida la acumulación de los aislamientos severos (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987; Moreno et al., 2008).

La utilización de genes de resistencia en variedades comerciales es una de las estrategias más eficaces para evitar pérdidas por virus de plantas (Rai, 2006). Sin embargo, la compleja biología reproductiva, su elevada heterocigosis, los largos periodos juveniles de las plantas de semilla y el gran tamaño que tienen en su fase adulta, entre otras han sido un gran obstáculo para la incorporación de estos genes dentro del mejoramiento genético convencional. La resistencia derivada del patógeno (PDR) en plantas transformadas representa una estrategia alternativa para lograr resistencia a CTV. La transformación de plantas de este cultivo se ha dado con la incorporación del gen de la CP (Domínguez et al., 2002; Mora-Aguilera et al., 2003; Loeza-Kuk, 2008), con el gen p23 (Ghorbel et al., 2001; Fagoaga et al., 2005) o construcciones derivadas de la 3'-UTR, con líneas transgénicas no siempre exitosas. La información disponible indica que la PDR es posible, pero factores desconocidos ajenos a la base genética puede afectar el fenotipo de la resistencia de las plantas obtenidas al propagar dicha planta (Moreno et al., 2008).

La utilización de la protección cruzada mediante la preinoculación con un aislamiento débil del virus para prevenir la expresión de un aislamiento más severo del mismo virus (Folimonova, 2013) ha sido usada desde hace mucho

tiempo para proteger variedades comerciales de cítricos susceptibles a CTV (Muller y Costa, 1977). Aunque es considerada una técnica que carece de fundamentos moleculares, que requiere largos periodos para seleccionar los aislamientos débiles con capacidad protectora y que existe el riesgo de evolución del aislamiento protector hacia formas más agresivas (Fulton, 1986), existen casos exitosos a nivel comercial que han permitido proteger y mantener la producción de naranja dulce Pera en Brasil (Costa y Müller, 1980) y proteger del picado de tallo en toronja en Sudáfrica (Van Vuuren et al., 1993), sin embargo, en este último país, actualmente se ha reportado zonas en donde ha fracasado o sólo ha proporcionado una protección temporal (Zablocki y Pietersen, 2014). Recientemente, se han relacionado diferentes mecanismos de la protección cruzada, la prevención de la entrada del virus a la células de las plantas (Steck and Rubin, 1966a,b; Lee et al., 2005), competencia entre el aislamiento preinoculado y el secundario por sitio de replicación intracelular, interferencia con el desensamble, replicación o traducción de los virus secundarios (Steck and Rubin, 1966a; Sherwood and Fulton, 1982; Adams and Brown, 1985; Abel et al., 1986; Karpf et al., 1997; Lu et al., 1998; Beachy, 1999; Lee et al., 2005), y la inducción del silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), inducido por el virus protector, proceso que forma parte del sistema natural de defensa de las plantas y que conduce a la degradación de forma específica de los ARNs virales (Ratcliff et al., 1999). En la actualidad, esta técnica se aplica comercialmente en forma rutinaria en Brasil (Rui Leite, 2014 Comunicado Personal IAPAR). Pero experimentalmente no se han hecho avances que incorporen criterios

poblacionales basados en los aportes modernos moleculares que permitan la aplicación de la epidemiología molecular a nivel regional con el fin de entender la estructura poblacional y sus cambios en el tiempo con el fin de seleccionar aislamientos estables y prevalentes en condiciones de campo. Adicionalmente, en México ha existido la demanda de productores de usar el naranjo agrio dentro de programas de certificación por las ventajas agronómicas para una citricultura con baja tecnología (Robles, 2012 Comunicado Personal).

LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., Litchman, A.H., & Pober, S.J. 1991. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders. Philadelphia. U.S.A. 417 p.
- Abel, P.P., Nelson, R.S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S.G., & Fraley, R. T. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco virus coat protein gene. *Science* 232: 738–743.
- Adams, R.H., & Brown, D.T. 1985. BHK cells expressing *Sindbis virus*-induced homologous interference allow the translation of nonstructural genes of superinfecting virus. *J. Virol.* 54: 351–357.
- Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F., & Moreno, P. 2000. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* 90: 134-138.
- ASERCA (Agencia de Servicios a la Comercialización y Desarrollo de Mercados Agropecuarios). (2016). Febrero 2015. URL: <http://www.aserca.gob.mx/Paginas/default.aspx>
- Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanarayana, T., Dawson, W.O. 2004. Cis-acting elements at opposite ends of the *Citrus tristeza virus* genome differ in initiation and termination of subgenomic RNAs. *Virology* 322: 41-50.
- Ayllón, M.A., Gowda, S., Satyanayanana, T., Karasev, A.V., Adkins, S., Mawassi, M., Guerri, J., Moreno, P., & Dawson, W.O. 2003. Effects of modification of

- the transcription initiation site context on *Citrus tristeza virus* subgenomic RNA synthesis. *J Virol* 77: 9232-9243.
- Ayllón, M.A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S.M., Guerri, J., Flores, R., & Moreno, P. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* 146: 27-40.
- Ayllón, M.A., Satyanarayana, T., Gowda, S., & Dawson, W.O. 2006. Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes* 32: 119-128.
- Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D.E., Clark, M.F., & Loebenstein, G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., & Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review Phytopathological* 27: 291-316.
- Barret, H.C. 1990. US 119, an intergeneric hybrid citrus scion breeding line. *HortScience* 25: 1670-1671.
- Beachy, R.N. 1999. Coat protein mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos.Trans.R. Soc. Lond.BBiol.Sci.* 354: 659-664.
- Bergua, M., Mark P. Zwart, M.P., El-Mohtar, C., Shilts, T., Elena, S.F., & Folimonova, S.Y. 2014. A Viral Protein Mediates Superinfection Exclusion at

- the Whole-Organism Level but Is Not Required for Exclusion at the Cellular Level. *Journal of virology* 88: 11327-11338.
- Cambra, M., Camarasa, E., Gorris, M.T., Garnsey, S.M., & Carbonell, E. 1991. Comparison of different immunosorbent assays for *Citrus tristeza virus* (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds)., Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 38-45.
- Costa, A.S., & Grant, T.J. 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector aphid *citricidus*. *Phytopathology* 41: 105-113.
- D' Urso, F., Ayllon, M.A., Rubio, L., Sambade, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., & Moreno, P. 2000. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* 49: 288-294.
- Dodds, J.A., Jarupat, T., Lee, J.G., & Roistacher, C.N. 1987. Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77: 442-447.
- Dolja, V.V., Karasev, A.V., & Koonin, E.V. 1994. Molecular Biology and Evolution of Closteroviruses: Sophisticated Build-up of Large RNA Genomes. *Annu Rev Phytopathol* 32: 261-285.
- Dominguez, A., Hermoso de Mendoza, A., Guerri, J., Cambra, M., Navarro, L., Moreno, P., & Pena, L. 2002. Pathogen derived resistance to *Citrus tristeza*

- virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing) plants expressing its p25 coat protein gene. *Mol Breeding* 10: 1-10.
- Duran-Vila, N., & Moreno, P. 2000. Enfermedades de los cítricos., Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa, 165 pp.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Distribution Maps of Quarantine Pest of Europe. Citrus tristeza closterovirus. http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_tristeza/CTV000_map.htm.
- Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. 2005. Viral-like symptoms induced by ectopic expression of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant Microbe Interactions* 18: 435–445.
- FAO (Food Agriculture and Organization of United Nations). (2016). FAOSTATS. Consultado el 1 de enero. URL: <http://faostat.fao.org/>
- Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., & Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology* 86:1331–1335.
- Folimonova, S.Y. 2013. Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Frontiers in microbiology* 4: 76.
- Gallie, D.R., & Kobayashi, M. 1994. The role of the 3'-untranslated regions of nonpolyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency. *Gene* 142: 159-165.

- Garnsey, S.M., & Muller, G.W. 1988. Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 46-54.
- Garnsey, S.M., Barrett, H.C., & Hutchinson, D.J. 1987. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19: 187-191.
- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Lee, R.F., Yokomi, R.K., Behe, C.C. 1995. Using the Beltsville international CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of citrus tristeza virus. En: *Proceedings of the 3rd International Workshop on Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies* (Lee RF, Rocha-Pena M, Niblett CL, Ochoa F, Eds). Lake Alfred, FL, USA: FAO, University of Florida, USDA-OICD, pp. 253-259.
- Garnsey, S.M., Gonsalves, D., & Purcifull, D.E. 1977. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 67: 956-968.
- Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M., & Henderson, C.T. 1993. Direct tissue blotting immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). En: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 39-50.

- Ghorbel, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27–36.
- Ghorbel, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27–36.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J., & Lee, R. 1993. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 44: 305-317.
- Góngora K. C. 2004. Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis MC COLPOS. Montecillo, Méx
- Gonsalves, D., Purcifull, D.E., & Garnsey, S.M. 1978. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68: 553-559.
- Gottwald, T. R., Garnsey S. M., Cambra, M., Moreno, P., Irely, M. and Borbon, J. 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits* 52: 397-404.
- Gottwald, T.R., Polek, M., and Riley, K. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of Citrus tristeza virus in the California Central Valley. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. N. Duran-Vila, R.G. Milne, and J.V. da Graça (Eds.). p. 83-94. IOCV. Riverside, CA.

- Gowda, S., Satyanarayana, T., Ayllon, M.A., Albiach-Marti, M.R., Mawassi, M., Rabindran, S., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. 2001. Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of *Citrus tristeza virus*: production of positive- and negative- stranded 3'-terminal and positive-stranded 5' terminal RNAs. *Virology* 286: 134-51.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., & Dawson, W.O. 2000. The p20 gene product of *Citrus Tristeza Virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274: 246–254.
- Gowda, S., Satyanayanana, T., Ayllon, M.A., Moreno, P., Flores, R., & Dawson, W.O. 2003. The conserved structures of the 5' nontranslated region of *Citrus tristeza virus* are involved in replication and virion assembly. *Virology* 317: 50-64.
- Grant, T.J., & Higgins, R.P 1957. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47: 272-276.
- Harper, S.J., Dawson, T.E., & Pearson, M.N. 2010. Isolates of Citrus tristeza virus that overcome Poncirus trifoliata resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology* 155: 471-480.
- Hearn, C.J., Garnsey, S.M., & Barret, H.C. 1993. Transmission of citrus tristeza virus resistance from breeding line US 119. *HortScience* 25: 123.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., & Pina, L.J.A. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, aphididae) in Spain. Ninth Conference of the IOCV. 23-27.

- Hernández, N.G. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 83.
- Herrera-Isidró, L. 2004. Caracterización biológica y molecular de aislados del virus tristeza de los cítricos (CTV) en México. Tesis doctoral. CINVESTAV-Irapuato. 185 p.
- Herrera-Isidró, 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.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumph, D.J., Niblett, C.L., & Garnsey, S.M. 1995. Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208: 576–582.
- Hilf, M.E., Mavrodieva, V.A., & Garnsey, S.M. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95: 909-917.
- Karasev, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. Annual Review of *Phytopathology* 38:293-324.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hulf, M.E., Koonim, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumph, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., & Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the *citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology* 208: 511-520.

- Karpf, A.R., Lenches, E., Strauss, E.G., Strauss, J.H., & Brown, D.T. 1997. Superinfection exclusion of alphaviruses in three mosquito cell lines persistently infected with *Sindbis virus*. *J. Virol.* 71: 7119–7123.
- Kong, P., Rubio, L., Polek, M., & Falk, B.W. 2000. Population structure and genetic diversity within California *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. *Virus Genes* 21: 139-145.
- Lee, R.F., & Bar-Joseph, M. 2000. Tristeza. *In*: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and J.H. Graham (Eds.). Compendium of citrus diseases. Second Edition. p. 61-63. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.
- Lee, R.F., & Rocha-Peña, M.A. 1992. Citrus tristeza virus. p. 226-249. *In*: Plant diseases of international importance III. Mukhapadhy, A.N.; Chaube, H.S.; Kumar, J. y Singh, U.S. (Eds.) Prentice Hall, N. Jersey.
- Lee, R.F., Baker, P.S., & Rocha-Peña, M.A. 1994. The *Citrus Tristeza Virus* (CTV). CAB International, UK. 197 p.
- Lee, Y.M., Tscherne, D.M., Yun, S.I., Frolov, I., & Rice, C.M. 2005. Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. *J. Virol.* 79: 3231–3242.
- Loeza-Kuk, E. 2008. Transmisibilidad de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados por genes del CTV. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 103.
- Loeza, K. E. 2003. Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Méx.

- Loeza-Kuk, E., Ochoa Martínez, D., Mora-Aguilera, G., Rivas Valencia, P., Gutiérrez-Espinosa A., Cintra de Jesús Junior, W., Villegas-Monter, A., and Arno Wulff, N. 2008. Acquisition of CSDAV and haplotypes of citrus tristeza virus by *Toxopetera citricida* and *Aphis spiraecola* and the implication on citrus sudden death. *Agrociencia* 42, 669-678.
- Loeza-Kuk, E., Palacios-Torres, E.C., Ochoa-Martínez, D., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Febres, V.J., Moore, G.A., & Alvarez-Ramos, R. 2005. Molecular characterization of citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas states, México. 407-411p. *In: Proc. 16th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA.*
- López, C., Ayllón, M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., & Flores, R. 1998. Sequence polymorphism in the 5' and 3' terminal regions of citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* 88: 685–691.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., & Flores, R. 2000. The 23-kDa protein coded by the 3-terminal gene of *citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology* 269: 462–470.
- Lu, B., Stubbs, G., & Culver, J.N. 1998. Coat protein interactions involved in tobacco mosaic tobamovirus cross-protection. *Virology* 248: 188–198.
- Lu, R., Folimonova, S.Y., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., & Ding, S.W. 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.

- Martín, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M.C., Moya, P., Guerri, J., Elena, S.F., & Moreno, P. 2009. Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology* 90: 1527-1538.
- Matthews, D.M., Riley, K., & Dodds, J.A. 1997. Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field during months of nonoptimal titer. *Plant Disease* 81: 525-529.
- Matthews, R.E.F. 1991. Plant virology. Third edition. Academic Press. USA. 835 p.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., & Bar-Joseph, J.M. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* 77: 2359-2364.
- McClellan, A.P.D. 1957. Tristeza virus of citrus: evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis Repr* 41: 821.
- Mehta, P., Bransky, R.H., Gauda, S., & Yokomi, R.K. 1997. Reverse transcription polymerase chain reaction detection of citrus tristeza virus in aphids. *Plant Disease* 81: 1066-1069.
- Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, M.A., & Becerra, H. 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus tristesas de los cítricos en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26: 223-230.
- Michaud, J.P., & Alvarez-Ramos, R. 2000. First collection of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, México. *Florida Entomologist* 83: 357-358.

- Mora-Aguilera, G., Ruiz-García, N., Loeza-Kuk, E., Cisneros-Hernández., J, Rivas-Valencia, P., Álvarez-Ramos, R., Ochoa-Martínez., D.L., Gutiérrez-Espinosa, M.A., & Góngora-Canul, C.C. 2003. Citrus tristeza closterovirus: consideraciones biológicas y epidemiológicas. pp. 1-25. *In: Memorias del Curso de Aprobación y Renovación en la Campaña contra el Virus Tristeza de los Cítricos.* 8-12 septiembre. Colegio de Postgraduados, Campus Veracruz, Ver. México.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiachi-Marti, M.R., Guerri, J., & Peña, L. 2008. *Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology* 9(2): 251-268.
- Moreno, P., Guerri, Ballester-Olmos, J. F., Albiach, R., & Martínez, M. E. 1993. Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42: 35-41.
- Muller, G.W., & Costa, A.S. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proceedings International Society of Citriculture* 3: 868-872.
- Muller, G.W., & Garnsey, S.M. 1984. Susceptibility of citrus varieties, species, citrus relatives, and non rutaceous plants to slash-cut mechanical inoculation with Citrus tristeza virus (CTV). *Proceedings 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* S.M. Garnsey, L.W. Timmer, and J.A. Dodds (Eds.). p. 33-40. IOCV. Riverside, CA.

- Muller, G.W., Costa, A.S., Kitajima, E.W., & Camargo, I.J.B. 1974. Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp. Proceedings 6th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. L.G. Weath and M. Cohen (Eds.). p. 75-77. IOCV. Riverside, CA.
- Narváez, G., Slimane, S. B., Ayllón, M. A., Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.
- Narváez, G., Slimane, S. B., Ayllón, M. A., Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.
- Narváez, G., Slimane, S. B., Ayllón, M. A., Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.
- Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. 1997. Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNA. *Virology* 228: 92-97.
- Nicolás, L., Milon, G., & Prina, E. 2002. Rapid differentiation of Old World Leishmania species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *J Microbiol Methods* 51: 295-299.

- Nikolaeva, O. V., Karasev, A. V., Garnsey, S. M. and Lee, R. F. 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Disease* 82: 1276-1280.
- Olson, E.O. 1956. Mild and severe strains of tristeza virus in Texas citrus. *Phytopathology* 46: 336-341.
- Olson, E.O. 1958. Responses of lime and sour orange seedlings and four scion-rootstock combination to infection by strains of tristeza virus. *Phytopathology* 48: 455-459.
- Pappu, H.R., Manjunath, K.L., Lee, R.F., & Niblett, C.L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3641-3644.
- Permar, T.A., Garnsey S.M., Gumpf, D.J., & Lee, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- Racchah, H.B., Loebenstein, G., & Singer, S. 1980. Aphid transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology* 70: 89-93.
- Ratcliff, F., MacFarlane, S., & Baulcombe, D.C. 1999. Gene silencing without DNA. RNA-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11: 1207-1216.
- Rivas, V.P., Loeza, K.E., Mora, A.G., Ruiz, G.N., Ochoa, M.D., Gutiérrez, E.A., & Febres, V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 493-507.

- Rivas-Valencia, P. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 131.
- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G. Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa, A., Cintra de Jesús Junior, W., Malvas C., & Arno Wulff, N. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del Citrus tristeza virus y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil. *Agrociencia* 42: 85-93.
- Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., & Yokomi, R.K. 1995. Citrus tristeza virus and its vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79: 437-445.
- Roistacher, C.N., & Bar-Joseph, M. 1987. Transmission of citrus Tristeza Virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and *Passiflora* species. *Phytophylactica* 19:179-182.
- Roistacher, C.N., & Moreno, P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 7-19.
- Román, R.C., Gutiérrez, E.A., Pérez-Molphe, B.E., Gutiérrez, C.R., y Gómez, L.M. 2003. Producción de plantas transgénicas de cítricos que pudiesen expresar resistencia a patógenos. Panamerican Plant Disease Conference, South Padre Island, Texas USA. 6-10 April.

- Roy, A., Manjunath, K.L., & Brlansky, R.H. 2005. Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of *Citrus tristeza virus* from India. *Virus Research* 113: 132–142.
- Roy, A., Ramachandran, P., & Brlansky, R.H. 2003. Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch Virol* 148: 707-722.
- Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M.L., Guerri, J., Moreno, P., & Falk, B.W. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75: 8054-8062.
- Ruíz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E., Ochoa-Martínez, D., Ramírez-Valverde, G., Gutiérrez-Espinosa, A., & Alvarez-Ramos, R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo de *Citrus tristeza virus* en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Hortícola* 15: 41-47.
- Sambade, A., Rubio, L., Garnsey, S.M., Costa, N., Müller, G.W., Peyrou, M., Guerri, J., & Moreno, P. 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathology* 51: 257-263.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllon, M.A., & Dawson, W.O. 2004. Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and

- its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 799-804.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. 2000. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278: 253–265.
- Satyanarayana, T., Siddarama, G., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindram S., & Dawson, W.O. 2002. The p23 protein of citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76: 473-483.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria). (2016). Consultado el 15 de enero. URL: <http://sinavef.senasica.gob.mx/SIIVEF/>
- Sherwood, J.L., & Fulton, R.W. 1982. The specific involvement of coat protein in tobacco mosaic virus cross-protection. *Virology* 119: 150–158.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2016). Consultado el 1 de febrero. URL: <http://www.siap.gob.mx/>
- Steck, F.T., & Rubin, H. 1966. The mechanism of interference between an *Avian leucosis virus* and *Rous sarcoma virus*, I establishment of interference. *Virology* 29: 628–641.
- Van Vuuren, S.P., Collins, R.P., & Da Graca, J.V. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 50: 112-116.

- Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguet, J.G., Pérez de San Román C., & Sanz, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *J Gen Virol* 67: 91-96.
- Vives, M.C., Rubio, L., Sambade, A., Mirkov, T.E., Moreno, P., Guerri, J. 2005. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a *Citrus tristeza virus* isolate. *Virology* 331: 232-237.
- Wallace, J.M. 1978. Virus and viruslike diseases. *In*: W. Reuther, E.C. Calavan, G.E., and Carman (Eds.). The citrus industry. Volume IV. Crop Protection. Chapter 2. p.67-184. Division of Agricultural Sciences. University of California. Berkeley.
- Wallace, J.M., & Drake, R.J. 1961. Seedling yellows in California. *In*: Proc. 2nd Conf. Int. Org. Citrus Virol. Price, W. C. (ed.) Gainesville, Florida. Pp. 141-149.
- Wallace, J.M., & Fawcett, H.S. 1947. Quick decline of orange trees- a virus disease. *Science* 105: 315-316.
- Weber, H.J. 1943. The tristeza disease of sour-orange rootstock. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 43: 160-168.
- Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M. E., Dawson, W. O., Galbraith, D. W., & Xiong, Z. 2007. Persistent Infection and Promiscuous Recombination of Multiple Genotypes of an RNA Virus within a Single Host Generate Extensive Diversity. *PLoS ONE* 2: 917.

- Yokomi, R. 1993. The brown citrus aphid: its role in the transmission of CTV. Citrus Tristeza Virus and Brown Citrus Aphid Workshop. Lake Alfred, Florida. April 1-2. 19-20 pp.
- Yokomi, R., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Peña, M.A., & Niblett, C.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and Transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 1078-1085.
- Roistacher, C.N., and Bar-Joseph, M. 1987. Aphid transmission for citrus tristeza virus: a review. *Phytophylactica* 19: 163-167.
- Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damsteegt, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Pena, M.A., & Niblett, C.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera, *Aphididae*) in Central-America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *J Econ Entomol* 87: 1078-1085.
- Zablocki, O., & Pietersen, G. 2014. Characterization of a novel citrus tristeza virus genotype within three cross-protecting source GFMS12 sub-isolates in South Africa by means of Illumina sequencing. *Archives of virology* 159: 2133-2139.

III. IMPLICACIÓN DE *Toxoptera citricida* EN LA VARIACIÓN GENÉTICA DEL *Citrus tristeza virus* EN MÉXICO

IMPLICATION OF *Toxoptera citricida* IN THE GENETIC VARIATION OF *Citrus tristeza virus* IN MEXICO

Santiago **Domínguez-Monge**¹, Emiliano **Loeza-Kuk**³, Ma. Alejandra **Gutiérrez-Espinosa**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**^{1,2}, Jorge Luis **Flores-Sánchez**¹, Daniel L. **Ochoa-Martínez**¹ y Vicente José **Febres Rodríguez**⁴.

¹Instituto de Fitosanidad y Fruticultura, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ²Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental-Mocochá, C.P. 97454. Mocochá, Yucatán. ⁴University of Florida, Horticultural Sciences Department, Gainesville, FL 32611, USA.

3.1. RESUMEN

En este estudio se realizó la caracterización molecular de 168 aislamientos de *Citrus tristeza virus* (CTV) colectados entre 2004 y 2015 en Yucatán, Veracruz y Tamaulipas, México para determinar la variabilidad genética y las relaciones filogenéticas mediante cuatro genes: ARN polimerasa ARN-dependiente (RdRp) p33, proteína de la cápside (CP) y p13, putativamente asociados con patogenicidad. La extracción de ARN se realizó por el método de CTAB y la RT-PCR por punto final utilizando los primers específicos para cada gen. El estudio se realizó en dos etapas. En etapa 1, los 168 aislamientos fueron secuenciados y

subsecuentemente analizados con el programa MEGA6. En etapa 2, 8 aislamientos (3 aislamientos de Yucatán, 3 de Veracruz y 2 de Tamaulipas) fueron seleccionados a partir de resultados de etapa 1 por su prevalencia y homología de secuencias. Se utilizó el método neighbor-joining con 1000 repeticiones de Bootstrap para generar los árboles filogenéticos. En el análisis comparativo de secuencias se incluyeron secuencias de 9 aislamientos mexicanos previos al ingreso de Tc y secuencias de 8 aislamientos de otros países (T30, T385, T36, VT, SY569, NUagA, NZ-M16 y NZ-B18) obtenidas en GenBank. Todos los aislados, excluyendo uno de Veracruz (Mx-Caz-Ver-KX029095) fueron de tipo moderado con una homología mayor a 99% para los genes p33, CP y p13. El gen RdRp no generó una clara agrupación de severos y moderados, sugiriendo que no está involucrado con patogenicidad. La diversidad de secuencias del ARN genómico (gRNA) de los 8 aislamientos analizados tuvo un patrón de divergencia similar al observado entre aislados provenientes de un periodo previo a la introducción y dispersión de Tc en México. Estos resultados sugieren que Tc no está aparentemente induciendo cambios en la estructura poblacional de CTV hacia una prevalencia de variantes severas en México. Esta información puede ser usada para la vigilancia de aislamientos específicos o para el análisis recurrente de la estructura poblacional en regiones específicas del país con propósito de monitorear riesgos epidémicos o para el uso de aislamientos moderados prevalentes para posible uso en protección cruzada.

Palabras clave: CTV, epidemiología molecular, diversidad genética, análisis filogenético.

3.2. INTRODUCCIÓN

El *Citrus tristeza virus* (CTV, familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es el agente causal de la tristeza de los cítricos, considerada históricamente una de las enfermedades virales más destructivas en el cultivo de los cítricos y la responsable de la muerte de más de 100 millones de árboles durante el siglo pasado (Moreno et al., 2008; Ruiz-García et al., 2009).

Los viriones de CTV son partículas filamentosas de un tamaño aproximado de 2000 nm de longitud con dos proteínas de la capsida (CP's) de 25 (capa proteica mayor, CP) y 27 kDa (capa proteica menor, CPm) que cubren aproximadamente el 95 y 5% del virión respectivamente (Febres et al., 1996; Satyanarayana et al., 2004). Su genoma es monopartita, constituido de una cadena simple de RNA de sentido positivo de aproximadamente 19.3 kb de longitud y organizado en 12 marcos de lectura abierto (ORFs por sus siglas en inglés) que codifican para al menos 19 proteínas (Karasev et al., 1995). Los dos ORFs del extremo 5', codifican proteínas relacionadas con replicación y se expresan a partir del ARN genómico (ARNg). El ORF1a codifica una poliproteína de 349 kDa, mientras el ORF1b una proteína con dominios de ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Karasev et al., 1995). Los ORFs del 2 hasta el 11 cubren la mitad del ARNg en el extremo 3' y no son requeridos para la replicación del ARN. Codifican (en dirección 5' a 3') las proteínas p33, p6, HSP70h, p61, CPm, CP, p18, p13, p20 y p23 involucradas en ensamble del virión, interacción con el hospedante, especificidad del vector, movimiento dentro de la planta y silenciamiento del ARN (Hilf et al., 1995; Navas-Castillo et al., 1997; Ayllón et al.,

2006). Una proteína de 23 kDa (p23), actúa como enlace del ribosoma (López et al., 2000) regulando la acumulación de cadenas positivas y negativas durante la replicación del ARN (Satyanarayana et al., 2002) y está involucrada en la expresión de síntomas (Ghorbel et al., 2001; Fagoada et al., 2005).

A nivel mundial, se ha reportado que el CTV infecta casi todas las especies de cítricos y sus híbridos, causando diferente tipo e intensidad de síntomas dependiendo del hospedante y del aislamiento viral (Roistacher & Moreno, 1991). Los síntomas más reportados del CTV son: 1) muerte rápida de la mayoría las especies de cítricos propagadas sobre el portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.); 2) picado de tallo del injerto; y 3) amarillamiento de plántulas en naranjo agrio, naranja dulce (*C. sinensis* (L.) Osbeck) y toronja (*C. paradisi* Macfad.). Sin embargo, en México prevalecen aislamientos moderados y la expresión es asintomática (Loeza-Kuk, 2003; Góngora, 2004; Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia, 2008; Ruiz-García et al., 2009; Rivas-Valencia et al., 2010). Los aislamientos que no inducen síntomas en limón mexicano [*C. aurantifolia* (Christm) Swingle] durante la caracterización biológica son catalogados como de tipo débil (Moreno et al., 2008).

En México, el CTV se detectó por primera vez en el estado de Tamaulipas en el año de 1983 y actualmente está presente en 21 estados citrícolas del país; mientras que [*Toxoptera citricida* (Kirkaldi), Tc] vector considerado como el más eficiente vector de CTV (Racchah, 1980; Hermoso de Mendoza et al., 1984; Gottwald et al., 1997; Loeza-Kuk et al., 2008), ingresó en 2000 por la Península de Yucatán (SENASICA, 2015). Muestreos recientes realizados en huertas de la

Península de Yucatán, indicaron que la incidencia de CTV fue menor al 36% (Domínguez-Monge et al., 2010). En los árboles de cítricos infectados, no se han observado síntomas severos de CTV, aun cuando el naranjo agrio es el portainjerto más predominante en la región, sugiriendo la prevalencia de aislamientos moderados (Rivas-Valencia et al., 2010; Hernández-Nava, 2013). El gobierno federal impulsó en los 90's una agresiva campaña contra el CTV, misma que fue suspendida por la extensiva detección de CTV pero condición asintomática, aunque se continúa el impulso de viveros certificados y la vigilancia de dispersión de Tc. Sin embargo, a pesar de la presencia actual de solo aislamientos asintomáticos de CTV y su aparente baja prevalencia en México, dos aspectos sugieren que el CTV se debe integrar a un modelo de vigilancia direccionado a razas específicas: 1) el establecimiento y dispersión de Tc en México y su actual desplazamiento a nuevas áreas cítricas en el territorio mexicano y 2) un posible cambio en la estructura poblacional de alta prevalencia de haplotipos moderados a una eventual prevalencia regional de un haplotipo o aislamiento severo debido a modificaciones en la frecuencia de haplotipos en regiones con presencia de Tc y por la predominancia de naranjo agrio (uno de los genotipos más usado comúnmente en los huertos cítricos y también uno de los más susceptible a CTV).

El análisis mediante la comparación de secuencias de nucleótidos es un procedimiento adecuado para la diferenciación de aislamientos de CTV y para la estimación de los cambios genéticos (Rubio et al., 2001). Estudios recientes sugieren que la transmisión por áfidos puede afectar significativamente la

estructura poblacional de aislamientos de CTV y puede ser un factor importante en su evolución (Moreno et al., 1993; Ballester-Olmos et al., 1993; Albiach-Martí et al., 2000; Santandreu et al., 2006). Variaciones en patogenicidad, selección negativa, flujo genético y recombinación de secuencias son factores importantes asociados con la evolución del CTV (Martín et al., 2009).

Estudios en México sobre la estructura poblacional del CTV con base en el gen CP, mostraron la ocurrencia de cambios en la frecuencia de haplotipos, pero dentro del rango de aislamientos de tipo moderado aun en el escenario epidémico donde Tc estuvo presente (Rivas-Valencia et al., 2010; Domínguez-Monge et al., 2014). En otro estudio reciente, se reportó variabilidad genética de CTV antes de la llegada de Tc a México (Herrera-Isidrón et al., 2009). Para México, como en muchas otras partes del mundo, el CTV continua como un problema latente, además de que aún no se conoce el efecto de la interacción con Tc en la diversidad genética del CTV actual, ni el efecto que puede ocurrir por la interacción con otros patógenos sistémicos como *Candidatus Liberibacter asiaticus* y *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. En este estudio el objetivo fue estudiar la variabilidad a nivel de la expresión de genes específicos de aislamientos de CTV provenientes de tres principales zonas citrícolas a 15 años del ingreso de Tc a México en comparación con la estructura poblacional antes de su llegada.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1. Aislamientos de CTV y caracterización

Los aislamientos de CTV fueron colectados de tres regiones citrícolas importantes de México entre 2004 y 2015 (Loeza-Kuk, 2003; Rivas-Valencia, 2008; Domínguez-Monge, 2011). Los aislamientos se seleccionaron de un total de 59 secuencias con base en estudios previos de la conformación polimórfica de la cadena sencilla de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP) con el fin de realizar una caracterización molecular muy fina y fueron propagados por injerto y mantenidos en el invernadero del Colegio de Postgraduados en el Estado de México. Estos aislamientos fueron caracterizados biológicamente utilizando plantas indicadoras inoculadas por injerto. La evaluación de los síntomas se realizó en limón mexicano (*C. aurantifolia*), naranjo agrio (*C. aurantium*), toronja “Duncan” (*C. paradisi*) y naranja dulce (*C. sinensis*) injertada sobre un patrón de naranjo agrio, como previamente descrito por Garnsey et al., (1991, 2005). Los ocho aislamientos de CTV estudiados se mantienen en la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y saneamiento Vegetal en el Estado de Querétaro, México.

3.3.2. Extracción total de ARN

Para la extracción de ARN, se utilizaron 0.1 g de nervadura central de hojas de plantas infectadas con CTV, macerándolas con 500 µL de buffer salino (NaCl 1.4M, Tris-HCl 0.1M pH 8.0) siguiendo el protocolo de Harris (2002). Después de la maceración, se añadieron 600 µL de amortiguador CTAB 2% + 0.5% de β-

mercaptoetanol preparado con agua libre de ARNasas, se mezclaron en vortex e incubaron a 55 °C por 30 min. Después, se añadieron 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico: fenol 25:24:1, se mezclaron en vortex y centrifugaron a 14 000 rpm por 10 min a 4 °C. De la fase acuosa, se tomaron 500 µL, se transfirieron a un nuevo tubo de microcentrífuga, se añadió 1/10 del volumen de acetato de amonio, un volumen de alcohol isoamílico, y se precipitó a -20 °C por 10 min. Luego, se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min, se descartó la fase superior, se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70% preparado con agua libre de ARNasas, y se centrifugó a 14 000 rpm por 1 min. Después de la centrifugación, el líquido se eliminó de los tubos los cuales se secaron a temperatura ambiente y los pellets se suspendieron en 30 µL de agua libre de ARNasas (Loeza-Kuk et al., 2008). La cantidad y calidad de ARN se determinó mediante espectrofotometría (Thermo Scientific NanoDrop™ 2000).

3.3.3. Síntesis de ADNc y amplificación por PCR

Para la técnica de la reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), se utilizaron cuatro pares de oligonucleótidos para amplificar cuatro regiones diferentes del ARNg del CTV (RdRp, p33, CP y p13; Cuadro 1). Para generar el cADN, aproximadamente 200 ng de ARN total fueron desnaturalizado a 95°C por 5 min. Posteriormente, se adicionaron 1 µL 10µM de cada uno de los iniciadores, 1 µL de MgCl₂ 10 mM, 0.4 µL de dNTP's 10 mM, 0.2 µL de RNaseOUT (40 U) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y 0.2 µL de la enzima

transcriptasa reversa M-MLV (200 U) (Promega, Madison,WI), hasta un volumen final de 6 μ L y se incubó a 42°C por 40 min.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de RT-PCR de cuatro regiones de ARN genómico de CTV.

ORF ^a	Gen	Secuencia del primer	Ubicación ^b	Tamaño del producto ^c
1b	RdRp	GCGGCTGTTATTGAGAGGTG	9519-9538	1,067
		GCACATAGAGCGGGCATAGT	10584-10565	
ORF 2	p33	AAGCTTATGTTTGCCTTCGCGAG	10861-10877	542
		GAATTCATATAAATATAATGGCTAA	11811-11791	
ORF 7	CP	ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG	16116-16139	672
		GCTCAACGTGTGTTAA	16774-16787	
ORF 9	p13	GACTTAGACACGAAGTGACC	17250-17269	360
		CTAAAGTAAGCTCGCATATTG	17721-17741	

^a ORF, Open Reading.

^b Ubicación de los primers en referencia al ARN genómico del aislamiento T385 de CTV.

^c Tamaño esperado de los productos de RT-PCR.

Los genes específicos de CTV fueron amplificados por PCR del cADN mediante la combinación de 2 μ L de cADN, 2.5 μ L de Buffer 10X, 1.25 μ L de MgCl₂ 50mM, 0.5 μ L de dNTPs 10mM, 0.25 μ L de cada uno de los iniciadores 10 μ M, 0.125 μ L de la enzima Taq DNA Polimerasa (1.25 U) (Promega, Madison,WI) y se completó con agua libre de ARNasas para un volumen final de 25 μ L. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador T100 (BioRad, Hercules, CA) como sigue: p13: un ciclo a 95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, 48.4°C por 30 s, y 72°C por 30 s; RdRp: un ciclo a 95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, 56.6°C por 30 s, y 72°C por 1.12 min; CP: un ciclo a 95°C por 1 min, 35 ciclos a 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, y 72°C por 1 min; p33: un ciclo a

95°C por 3 min, 40 ciclos a 95°C por 30 s, 60.4°C por 30 s, y 72°C por 48 s. Al término de los ciclos se dió un paso de extensión final de 5 min a 72°C en todas las muestras. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y observados bajo luz ultravioleta usando un transiluminador después de ser teñido con bromuro de etidio.

Los fragmentos amplificados de ADN correspondientes a cada gen de CTV (RdRp, p33, CP, p13) fueron purificados utilizando el método de perlas de vidrio GeneClean (Bio 101, Vista, CA) y directamente secuenciados con los oligonucleótidos específicos a cada gen.

3.3.4. Alineamiento de secuencias y análisis filogenético

Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando el programa BioEdit 7.1.0 (Hall, 1990). Los alineamientos múltiples de las secuencias de nucleótidos, distancias genéticas, tasas de sustituciones de nucleótidos y relaciones filogenéticas se estimaron con el programa MEGA (Análisis Genético de Evolución Molecular) versión 6 (Thompson et al., 1994; Tamura et al., 2013). Se usó el algoritmo Clustal W para calcular las distancias genéticas de los aislamientos de CTV por el método de Kimura two-parameter (Kimura, 1980). Se determinaron las tasas de sustituciones sinónimas (d_S) y no sinónimas (d_N) por el método de Pamilo y Bianchi (Pamilo y Bianchi, 1993) y Li (Li, 1993). Se estimaron las relaciones filogenéticas con el método neighbor joining y la confiabilidad de los grupos se evaluó con análisis de bootstrap (1000 repeticiones) (Felsenstein 1985).

Las secuencias de nucleótidos de los aislamientos mexicanos obtenidos en este estudio fueron depositados en la base de datos del GenBank bajo los números de acceso: KX029088 a KX029119.

Los números de acceso de otras secuencias de nucleótidos usadas en este estudio son: T36 (U166034) (Karasev et al., 1995; Pappu et al., 1994) y T30 (AF260651) (Albiach-Martí et al., 2000), VT (U56902) (Mawassi et al., 1996), T385 (Y18420) (Vives et al., 1999), SY568 (AF001623) (Yang et al., 1999), NUagA (AB011185) (Suastika et al., 2001), Mex. (DQ272579) (Quiroz et al., 2008), NZ-M16 (EU857538), NZ-B18 (FJ525436) (Harper et al., 2009), TAM11 (AF342890, AY652895), NL8 (AF342891, AY652892), VER2-2 (AF342892), QR2753-1 (AF342893, AY652893), BC15-1 (AF342894, AY652899) MichL9A11/9-1 (AF342895), Colima 1997 (AY649491) y Yucatán 2000 (AY649492) (Herrera-Isidró et al., 2009).

3.4. RESULTADOS

3.4.1. Caracterización biológica de aislamientos de CTV

En los síntomas observados en las plantas indicadoras no hubo diferencias importantes entre los aislamientos de CTV (Cuadro 2). No se observó clorosis o picado de tallo en toronja, naranjo agrio o naranja dulce injertada sobre naranjo agrio. En limón mexicano no se observó tampoco picado de tallo y el acucharado de hoja fue débil (T1-Yuc, T2-Yuc, T5-Tams, y T7-Ver) o moderado (T3-Yuc, T4-Ver y T6-Tams). No se observó decaimiento en naranja dulce injertada sobre

naranja agrio. Estos resultados indican que todos los aislamientos de CTV analizados fueron débiles.

Cuadro 2. Origen y caracterización biológica de ocho aislamientos mexicanos de CTV.

Origen	Aislamientos de CTV	Localidad	Fecha de muestreo	LM ^a		Tor, NA o ND/NA ^a	
				AH ^b	PT ^b	Clor. ^b	PT ^b
Yucatán	T1-Yuc	Ticul	2015	1 ^c	0	0	0
	T2-Yuc	Muna	2015	1	0	0	0
	T3-Yuc	Kinchil	2015	2	0	0	0
Veracruz	T4-Ver	Mnez. de la Torre	2004	2	0	0	0
	T7-Ver	Mnez. de la Torre	2004	1	0	0	0
	Caz-Ver	Cazones	2015	N ^d	N	N	N
Tamaulipas	T5-Tams	Güemes	2004	1	0	0	0
	T6-Tams	Guemez	2004	2	0	0	0

^a Especies indicadoras: LM, limón mexicano (*Citrus aurantifolia*); Tor, toronja (*Citrus paradisi*); NA, naranja agrio (*Citrus aurantium*); ND, naranja dulce (*Citrus sinensis*).

^b AH, acucharado de hoja; PT, picado de tallo; Clor., clorosis.

^c Intensidad de síntomas registrados de 1 a 3 con: 1 débil, 2 moderado y 3 severo.

^d N, no caracterizado biológicamente.

3.4.2. Relaciones filogenéticas entre aislamientos de CTV

Se realizó la comparación de los aislamientos mexicanos con respecto a aquellos reportados previamente de otros países y con antecedentes de expresión sintomatológica: nueve aislamientos tipo severo, T36 (muerte rápida de Florida), VT (muerte rápida y picado de tallo en toronja de Israel), SY568 (picado de tallo y amarillamiento de plántulas de California), NUagA (amarillamiento de plántulas de Japón), Mex (picado de tallo y muerte rápida de México), NZ-M16 (picado de tallo

débil en naranja dulce de Nueva Zelanda), NZ-B18 (picado de tallo severo y amarillamiento de plántulas de Nueva Zelanda), TAM11 (aclaramiento de nervadura, picado de tallo y muerte rápida de México), BC15-1 (aclaramiento de nervadura y picado de tallo de México) y, ocho aislamientos débiles, T385 (de España), T30 (de Florida), NL8, VER2-2, QR2753-1, MichL9A11/9-1, Colima 1997 y Yucatán 2000 (de México).

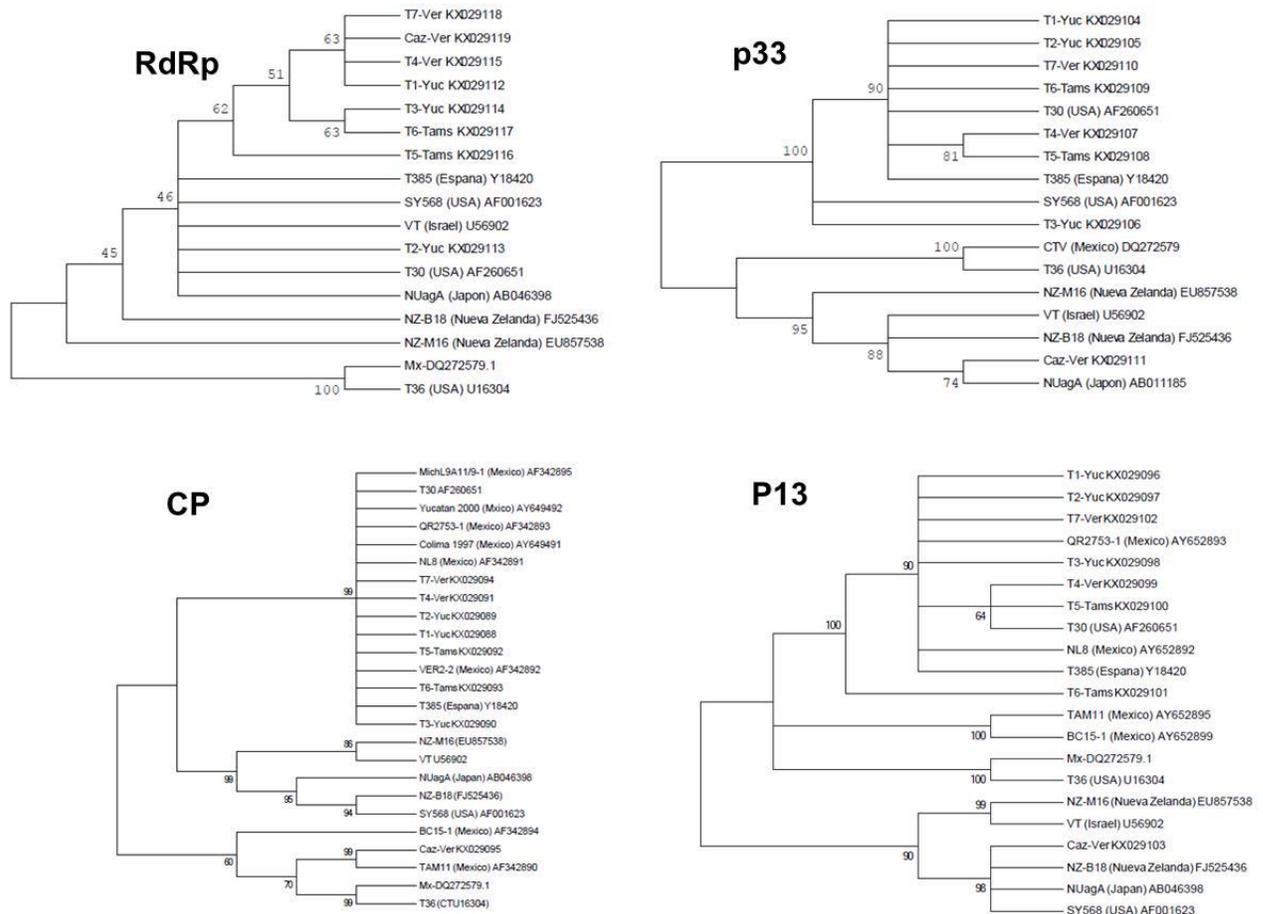


Figura 1. Árboles filogenéticos de las regiones genómicas RdRp, p33, CP y p13 para 8 aislamientos de CTV. Los árboles fueron generados en MEGA usando el método neighbor-joining. En las ramas se muestra el porcentaje de réplicas de los grupos de aislamientos con la prueba de bootstrap (1000 bootstrap).

En la Figura 1 se muestran los árboles obtenidos para cada gen. En los árboles de los genes p33, CP y p13, la mayoría de los aislamientos mexicanos de CTV se agruparon en un mismo grupo, excepto el aislamiento Caz-Ver, el cual fue agrupado con el resto de los aislamientos.

Los aislamientos T1-Yuc, T2-Yuc, T3-Yuc, T4-Ver, T5-Tams, T6-Tams y T7-Ver se agruparon con los aislamientos débiles de Florida (T30), de España (T385) y, con aquellos de México reportados antes de la llegada de Tc (NL8, VER2-2, QR2753-1, MichL9A11/9-1, Colima 1997 y Yucatán 2000). Este grupo, fue consistente en las tres regiones analizadas con valores de bootstrap mayores a 99%. El aislamiento Caz-Ver, fue ubicado en diferentes grupos severos. Uno de estos grupos con un valor de bootstrap del 99%, agrupó a Caz-Ver junto con el aislamiento TAM11 de México (reportado antes de la llegada de Tc) que causa aclaramiento de nervadura y picado de tallo severo en limón mexicano injertado sobre *C. macrophylla*.

El análisis filogenético del gen RdRp reveló un árbol con valores de bootstrap débiles en las ramas, indicando inconsistencias en el agrupamiento (Fig. 1).

3.4.3. Distancia genética, sustituciones sinónimas y no sinónimas de nucleótidos entre aislamientos de CTV

La diversidad de secuencias calculada para el grupo débil fue similar para las cuatro regiones analizadas en un rango de 0.003 a 0.013. Opuestamente, el

grupo severo mostró un aumento de la diversidad especialmente hacia el extremo 5' del genoma (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio de la distancia de nucleótidos entre grupos de aislamientos de CTV con respecto a diferentes regiones genómicas.

Región de CTV	Grupo de CTV	$D \pm SE^a$	$d_N \pm SE^b$	$d_S \pm SE^c$	d_N/d_S^d
<i>Presencia de Toxoptera citricida</i>					
RdRp	Débil	0.013 ± 0.007	0.004 ± 0.003	0.013 ± 0.010	0.307
	Severo	0.117 ± 0.020	0.031 ± 0.012	0.532 ± 0.131	0.058
	Todo	0.680 ± 0.012			
p33	Débil	0.012 ± 0.003	0.009 ± 0.003	0.013 ± 0.006	0.692
	Severo	0.148 ± 0.013	0.070 ± 0.011	0.395 ± 0.051	0.177
	Todo	0.126 ± 0.011			
CP	Débil	0.005 ± 0.002	0.001 ± 0.001	0.010 ± 0.005	0.100
	Severo	0.103 ± 0.017	0.025 ± 0.009	0.281 ± 0.053	0.088
	Todo	0.060 ± 0.008			
p13	Débil	0.007 ± 0.003	0.007 ± 0.003	0.002 ± 0.002	3.500
	Severo	0.099 ± 0.018	0.129 ± 0.026	0.044 ± 0.024	2.931
	Todo	0.073 ± 0.008			
<i>Ausencia de Toxoptera citricida</i>					
CP	Débil	0.003 ± 0.001	0.001 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.166
	Severo	0.810 ± 0.012	0.025 ± 0.007	0.220 ± 0.038	0.113
	Todo	0.065 ± 0.008			
p13	Débil	0.003 ± 0.003	0.005 ± 0.005	0.000 ± 0.000	-
	Severo	0.081 ± 0.013	0.031 ± 0.012	0.026 ± 0.015	1.192
	Todo	0.092 ± 0.011			

^a D, diversidad de nucleótidos (número promedio de sustitución de nucleótidos por sitio entre pares de secuencias); SE, Error estándar.

^b d_N , valor de sustituciones no sinónimas por sitios no sinónimos.

^c d_S , valor de sustituciones sinónimas por sitios sinónimos.

^d d_N/d_S , tasa promedio entre sustituciones no sinónimas y sinónimas para cada par de comparaciones. d_N , d_S , y d_N/d_S se estimaron por el método Pamilo y Bianchi (Pamilo y Bianchi, 1993) y Li (Li, 1993).

Interesantemente, una observación puede ser enfatizada en los genes CP y p13. Las regiones genómicas de CP y p13 con presencia de Tc mostraron baja diversidad (0.060 y 0.073, respectivamente), similar a aquellas con ausencia de este vector (0.065 y 0.092, respectivamente), sugiriendo que su presencia no influyó en un cambio de la diversidad genética del genoma del CTV (Cuadro 3).

Para estimar el grado de presión selectiva sobre cada región genómica, se calcularon las sustituciones sinónimas y no sinónimas con presencia y ausencia de Tc. Se encontraron diferencias entre las tasas de mutaciones no sinónimas (d_N) y de mutaciones sinónimas (d_S) en las cuatro regiones analizadas (Cuadro 4). De acuerdo a Martín et al., (2009), los valores d_N/d_S pueden ubicarse en cuatro categorías de selección: 1) una selección negativa alta ($d_N/d_S < 0.1$); 2) selección negativa moderada ($0.1 < d_N/d_S < 0.4$); 3) selección negativa débil ($0.4 < d_N/d_S < 1$); y 4) selección positiva ($d_N/d_S > 1$). Se detectó selección negativa moderada en las regiones RdRp y CP del grupo débil; selección negativa baja ocurrió en la región p33, y selección positiva en la región p13 de ambos grupos (presencia y ausencia de Tc). En general, los valores d_N fueron más bajos que los valores d_S ($d_N/d_S < 1$) en tres regiones, lo que sugiere que han estado bajo presión de selección en el proceso evolutivo.

3.5. DISCUSIÓN

Se analizó por primera vez la diversidad de diferentes regiones genómicas de aislamientos de CTV de México posterior al ingreso de Tc. Las relaciones filogenéticas ya han sido analizadas en México utilizando regiones genómicas

(Herrera-Isidrón et al., 2009) pero de aislamientos colectados antes de la llegada de este vector.

Para entender la diversidad entre los diferentes aislamientos de CTV de México, se analizaron cuatro regiones de los extremos opuestos del ARNg; un gen (RdRp) correspondiente al módulo de replicación (ORF 1b) y tres genes (p33, CP y p13) del módulo implicado en el ensamble del virión y del movimiento de célula a célula.

Después de 15 años de interactuar con Tc, los análisis filogenéticos ubicaron a la mayoría de los aislamientos mexicanos de CTV en un mismo grupo. Los aislamientos con las regiones que mejor discriminaron (p33, CP y p13) mostraron que aislamientos de regiones sin Tc y con Tc no se agruparon en ningún caso en forma independiente. Esto sugiere que el vector puede estar únicamente diseminando aislamientos moderados (Loeza-Kuk, 2008) sin la putativa selección de severos posiblemente porque no existen en el “pool” de aislamientos regionales (Hernández-Nava, 2013). Las secuencias de los aislamientos de CTV pueden ser asignadas a tres genotipos: genotipo T36, genotipo T30 y genotipo VT (López et al., 1998; Hilf et al., 1999; Ayllón et al., 2001) y los diferentes genotipos agruparse dentro de un mismo grupo (Hilf et al. 2005; Velázquez-Monreal et al., 2009). En este sentido, siete aislamientos mexicanos se agruparon con aislamientos débiles de tipo T30, y uno (Caz-Ver) con aislamientos severos de tipo T36 que causan aclaramiento de nervadura y picado de tallo severo en limón mexicano injertado sobre *C. macrophylla*. Esto demostró diferencias genéticas, aunque no significativas, entre las poblaciones de

CTV de aislamientos mexicanos. Sin embargo, en ambos casos (moderado/severo) fueron similares a las de poblaciones de regiones antes del arribo de Tc al país, indicando que no hay un cambio en su estructura a nivel molecular.

La diversidad de secuencias calculada para el grupo débil fue similar para las cuatro regiones analizadas. En el grupo severo mostró un aumento de la diversidad especialmente hacia el extremo 5' del genoma. Característica ligada al CTV (Karasev et al. 1995). Las regiones genómicas de CP y p13 con presencia de Tc mostraron baja diversidad, similar a aquellas con ausencia de este vector, sugiriendo que su presencia no influyó en un cambio de la diversidad genética del genoma del CTV. La mayor homogeneidad se encontró con estos genes ya que generó menor distancia intragrupo, lo que sugiere que estas regiones pueden ser usadas para estudios de variabilidad. La región que generó la menor homogeneidad intragrupos fue p33 seguido de RdRp, lo que sugiere que no están fuertemente asociadas con patogenicidad a pesar que p33 está asociada con infección (Bergua et al 2014). La p13 es una región poco conocida en su expresión génica pero en este trabajo discriminó bien por el tipo de daño (moderado vs severo).

El análisis de presión selectiva sobre las diferentes regiones sugiere que tres regiones examinadas son sometidas a selección negativa sugiriendo una estabilidad natural de los aislamientos estudiados. Esta presión fue moderada en las regiones RdRp y CP, pero baja en p33. Aunque, los resultados sugieren que el extremo 3' del genoma fue más conservado que el extremo 5', algunas de las

variantes producidas por mutación deben ser más fácilmente eliminadas en el extremo 3' del genoma de CTV mediante la presión selectiva encontrada en el proceso evolutivo de estos aislamientos.

En conclusión, el análisis de las relaciones filogenéticas y de variación genética de un grupo selecto de aislamientos mexicanos de CTV proveniente de regiones citrícolas sin presencia y con presencia de Tc, evidencian que el genoma de las poblaciones de regiones con Tc tiene la misma divergencia de secuencias que aquellas poblaciones sin presencia de Tc reportadas antes del arribo de Tc al país (Herrera-Isidrón et al. 2009). La baja diversidad genética encontrada entre los aislamientos de CTV, sugiere la presencia de una estructura poblacional del CTV con variaciones limitadas dentro de aislamientos con comportamiento moderado, lo cual ya se había demostrado a nivel intraparculario (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia, 2008). Esta información puede ser usada para la vigilancia de aislamientos específicos o para el análisis recurrente de la estructura poblacional en regiones específicas del país con propósito de monitorear riesgos epidémicos o para el uso de aislamientos moderados prevalentes para posible uso en protección cruzada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) (Proyecto: PM09-4002). Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos (GIIC) y al Laboratorio Nacional de Referencia Fitosanitaria (LANREF).

3.6. LITERATURA CITADA

- Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., Lopez, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. (2000). Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, 74, 6856-6865.
- Ayllón, M.A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S.M., Guerri, J., Flores, R., & Moreno, P. (2001). Polymorphism of the 5' terminal region of citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology*, 146, 27-40.
- Ayllón, M.A., Satyanarayana, T., Gowda, S., & Dawson, W.O. (2006). Variations in two gene sequences of *Citrus tristeza virus* after host passage. *Virus Genes*, 32, 119-128.
- Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E.A., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L. (1993). Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42, 219-229.
- Bergua, M., Mark P. Zwart, M.P., El-Mohtar, C., Shilts, T., Elena, S.F., & Folimonova, S.Y. (2014). A Viral Protein Mediates Superinfection Exclusion at the Whole-Organism Level but Is Not Required for Exclusion at the Cellular Level. *Journal of virology*, 88, 11327-11338.
- Domínguez-Monge, S., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Rivas-Valencia, P., Ruiz-García, N., Días-Padilla, G., Acevedo-Sánchez, G., Munguía-Rosales, R., Velázquez-Toledo, J., Escalante-Márquez, F., & Robles-García, P.

- (2010). Regionalización epidemiológica de la tristeza de los cítricos en la Península de Yucatán. *In: Memoria de la Reunión Nacional de Investigación Agrícola y Forestal. Del 22-27 de Noviembre. Campeche, México*
- Domínguez-Monge, S., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Ochoa-Martínez, D., Febres, V.J., Hernández-Nava, G., & Martínez-Bustamante, V. (2014). Epidemiología molecular de aislamientos de *citrus tristeza virus* de la Península de Yucatán. *In: Congreso Internacional de Fitopatología. Del 20-24 de Julio. Ixtapan de la Sal, Estado de México, México.*
- Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2005). Viral-like symptoms induced by ectopic expresi'ón of the p23 gene of *Citrus tristeza virus* are citrus specific and do not correlate with the pathogenicity of the virus strain. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 18, 435–445.
- Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., & Niblett, C.L. (1996). The p27 protein is present at one end of *Citrus tristeza virus* particles. *Phytopathology*, 86, 1331–1335.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Garcia-Arenal, F., Fraile, A., & Malpica, J.M. (2001). Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 157–186.
- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M.E., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Yokomi, R.K., & Hartung, J.S. (2005). Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV)

- isolates. In: *Proceedings of the 16th conference of the international organization of citrus virologists (IOCV)*, Mexico. pp. 75-93.
- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Yokomi, R.K., & Lee, R.F. (1991). Development of a world wide collection of *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of 11th Conference of the International Organization of Citrus Virus*. IOCV, Riverside. pp. 113-120.
- Ghorbel, R., López, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., & Peña, L. (2001). Transgenic citrus plants expressing the *Citrus tristeza virus* p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology*, 2, 27–36.
- Góngora, K.C. (2004). Regionalización, riesgo de establecimiento y caracterización espacial de focos del Citrus Tristeza Closterovirus en Tamaulipas, México. Tesis MC COLPOS. Montecillo, Méx. pp. 145.
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. & Borbon, J. (1997). Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of citrus tristeza virus. *Fruits*, 52, 397-404.
- Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L., Navas-Castillo, J., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, P., & Dawson, W.O. (2000). The p20 gene product of *Citrus Tristeza Virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*, 274, 246–254.
- Hall, T.A. (1990). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

- Harris, A. (2002). *Nepoviruses and Their Diagnosis in Plants: A Novel Polymerase Chain Reaction Diagnostic Test for Nepoviruses in Nursery Stock*. Department of Agriculture, Fisheries, and Forestry. Biosecurity Australia.
- Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F., & Pina, L.J.A. (1984). Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, aphididae) in Spain. Ninth Conference of the IOCV. 23-27.
- 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.E., Karasev, A.V., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O., & Garnsey, S.M. (1999). Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology*, 89, 336-342.
- Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumph, D.J., Niblett, C.L., & Garnsey, S.M. (1995) Characterization of *Citrus tristeza virus* subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, 208, 576–582.
- Hilf, M.E., Mavrodieva, V.A., & Garnsey, S.M. (2005). Genetic marker analysis of a global collection of isolates of citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology*, 95, 909-917.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hulf, M.E., Koonim, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumph, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., & Dawson, W.O. (1995). Complete sequence of the *citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, 208, 511-520.

- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular Evolutionary*, 16, 111-120.
- Li, W.H. (1993). Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *Journal of molecular evolution*, 36, 96-99.
- Loeza Kuk. E. (2008). Transmisibilidad de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) por áfidos y evaluación de la resistencia en cítricos transformados por genes del CTV. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 103.
- Loeza, K.E. (2003). Epidemiología y caracterización molecular de aislamientos mexicanos del citrus tristeza closterovirus. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 85.
- Loeza-Kuk, E., Ochoa-Martínez, D., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Gutiérrez-Espinosa A., Cintra de Jesús Junior, W., Villegas-Monter, A., & Arno Wulff, N. (2008). Acquisition of CSDAV and haplotypes of citrus tristeza virus by *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* and the implication on citrus sudden death. *Agrociencia*, 42, 669-678.
- López, C., Ayllón, M.A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., & Flores, R. (1998). Molecular variability of the 5'- and 3'-terminal regions of *Citrus tristeza virus* RNA. *Phytopathology*, 88, 685-691.
- López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., & Flores, R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3-terminal gene of *citrus tristeza virus* is an RNA-binding protein. *Virology*, 269, 462-470.
- Lu, R., Folimonova, S.Y., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W. (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.
- Martín, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M.C., Moya, P., Guerri, J., Elena, S.F., & Moreno, P. (2009). Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology*, 90, 1527-1538.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., & Bar-Joseph, M. (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology*, 77, 2359-2364.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiachi-Marti, M.R., Guerri, J., & Peña, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268.
- Moreno, P., Guerri, Ballester-Olmos, J. F., Albiach, R., & Martínez, M. E. (1993). Separation and interference of strains from a *Citrus tristeza virus* isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology*, 42, 35-41.
- Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Gowda, S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. (1997). Kinetics of accumulation of *Citrus tristeza virus* RNAs. *Virology*, 228, 92– 97.
- Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3, 418–426.
- Pamilo, P., & Bianchi, N.O. (1993). Evolution of the Zfx and Zfy genes: rates and interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 271-281.

- Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., & Niblett, C.L. (1994). Nucleotide sequence and organization of eight 30 open reading frames of the *Citrus tristeza closterovirus* genome. *Virology*, 199, 35–46.
- Racchah, H.B., Loebenstein, G., & Singer, S. (1980). Aphid transmissibility variants of citrus tristeza virus in infected citrus trees. *Phytopathology*, 70, 89-93.
- Rivas-Valencia, P. (2008). Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* (CTV) en México y Brasil. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx. Pp. 131.
- Rivas, V.P., Loeza, K.E., Mora, A.G., Ruiz, G.N., Ochoa, M.D., Gutiérrez, E.A., Febres, V. (2010). Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 493-507.
- Roistacher, C.N., & Moreno, P. (1991). Theworldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus* a review. In: Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. Proc 11th Conference International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp 7–19.
- Rubio, L., Ayllon, M.A., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., & Falk, B.W. (2001). Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75, 8054-8062.

- Ruíz-García, N. (2008). Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis Doc. COLPOS. Montecillo, Méx.
- Sentandreu, V., Castro, J.A., Ayllon, M.A., Rubio, L., Guerri, J., Gonzalez-Candelas, F., Moreno, P., & Moya, A. (2006). Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) after host passage. *Archives of Virology*, 151, 875-894.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M., & Dawson, W.O. (2000). Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology*, 278, 253–265.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Albiach-Martí, M.R., Rabindran, S., & Dawson, W.O. (2002). The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology*, 76, 473–483.
- Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., & Dawson, W.O. (2004). Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 799–804.
- SENASICA (Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria) (2015). El virus de la tristeza de los cítricos. www.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?...24049...

- Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T.H.I., & Okuda, S. (2001). Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolates. *Journal of General Plant Pathology*, 67, 73-77.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steche, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2799.
- Thompson, J.D., Higgins, D.J., & Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Velazquez-Monreal, J.J., Mathew, D.M., & Dodds, J.A. (2009). Segregation of distinct variants from *Citrus tristeza virus* isolate SY568 using aphid transmission. *Phytopathology*, 99, 1168-1176.
- Vives, M.C., Rubio, L., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal of General Virology*, 80, 811-816.
- Yang, Z.N., Mathews, D.M., Dodds, J.A., & Mirkov, T.E. (1999). Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes*, 19, 131-142.

IV. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS MODERADOS DE *Citrus tristeza virus* PARA SU APLICACIÓN EN UN PROGRAMA DE PROTECCIÓN CRUZADA EN MÉXICO

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MILD ISOLATES OF *Citrus tristeza virus* FOR THEIR USE IN A CROSS-PROTECTION PROGRAM IN MÉXICO

Santiago **Domínguez-Monge**¹, Emiliano **Loeza-Kuk**³, Ma. Alejandra **Gutiérrez-Espinosa**¹, Gustavo **Mora-Aguilera**^{1,2}, Jorge Luis **Flores-Sánchez**¹, Daniel L. **Ochoa-Martínez**¹, Vicente José **Febres Rodríguez**⁴ y Domingo **Colmenares Aragón**⁵.

¹Instituto de Fitosanidad y Fruticultura, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ²Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental-Mocochá, C.P. 97454. Mocochá, Yucatán. ⁴University of Florida, Horticultural Sciences Department, Gainesville, FL 32611, USA. ⁵Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal, C.P. 76020. Querétaro, Querétaro.

4.1. RESUMEN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) ha sido el patógeno viral históricamente más destructivo los cítricos. La infección del CTV normalmente implica una mezcla de variantes. Una estrategia de manejo eficiente usada en cítricos es la protección cruzada mediante aislamientos moderados. Sin embargo, esta estrategia requiere

una clara comprensión de la estructura poblacional del CTV bajo condiciones de campo. El objetivo principal del presente estudio fue caracterizar biológicamente 7 aislamientos mexicanos (Yucatán 3, Veracruz 2 y Tamaulipas 2) representativos del grupo filogenético moderado con la mayor prevalencia regional (Capítulo III). Cada aislamiento fue inoculado por medio de injerto (2-3 yemas) en plantas de 12 meses de edad de limón mexicano (*C. aurantifolia* Swing), naranjo agrio, toronja “Duncan” (*C. paradisi* Macfad.) y naranja dulce (*C. sinensis*) sobre naranjo agrio. Un total de 84 plantas fueron mantenidas a temperaturas de 18 a 24 °C durante 12 meses en el invernadero de la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV-SENASICA). Todas las plantas fueron mensualmente evaluadas por seis meses a partir del segundo mes después de la inoculación para la detección de CTV mediante PCR en tiempo real y para el tipo e intensidad de síntomas (reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos, reducción de unidades clorofila, amarillamiento, aclaramiento de nervadura, acucharado de hoja y picado de tallo). T1-Yuc y T2-Yuc 2 no indujeron ningún tipo de síntoma, excepto un débil acucharado en limón mexicano. Las plantas de naranjo agrio, naranja dulce sobre naranjo agrio y toronja infectadas con los aislamientos T7-Ver, T4-Ver y T4-Ver, respectivamente, tuvieron reducción del crecimiento de 7.7 cm, 13.9 cm y 6,6 cm ($P \leq 0.05$) y también presentaron acortamiento de entrenudos de hasta 2 cm para naranja dulce sobre agrio con T4-Ver ($P \leq 0.05$). En limón mexicano T4-Ver y T6-Tams indujeron síntomas de acucharado de hoja y aclaramiento de nervaduras, pero en todos los casos dentro de un rango de severidad débil (1) a moderado (2), según una escala arbitraria de

0 (sana) a 3. No se observó la presencia de picado de tallo en las diferentes plantas indicadoras. En ninguna especie indicadora hubo diferencias en la reducción de las unidades clorofila medidas con el equipo SPAD 502 plus ($P \leq 0.05$). Este estudio soporta la viabilidad de algunos de estos aislamientos, seleccionados regionalmente, para un programa de protección cruzada en México, en particular en la combinación naranjo dulce sobre naranjo agrio

Palabras clave: CTV, plantas indicadoras, patogenicidad, síntomas

4.2. INTRODUCCIÓN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) (familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es el agente causal de la tristeza de los cítricos, históricamente considerada una de las enfermedades más destructivas en de los cítricos (Moreno et al. 2008). El CTV, dependiendo de la variante, causa varios síntomas. Aislamientos severos causan decaimiento rápido (tristeza), picado de tallo (PT) y amarillamiento de plántulas (AP) (Bar-Joseph et al. 1989). La tristeza puede causar la muerte de la mayoría de las especies de cítricos injertadas sobre el patrón naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). El síntoma PT causa acanalado en la madera (xilema) de los tallos, lo cual retrasa el crecimiento y reduce la producción en todas las especies de cítricos independientemente del portainjerto. Las características de AP es amarillamiento de hojas y retraso del crecimiento (Moreno et al. 2008).

La caracterización de aislamientos del CTV mediante indexado biológico se ha usado como técnica de diagnóstico eficaz en cítricos (Ballester-Olmos et al.

1993). Se basa en la utilización de plantas indicadoras de especies de cítricos, las cuales reaccionan ante la infección del virus expresando una variedad de síntomas diferenciales (Roistacher, 1991). La planta indicadora recomendada para estudios biológicos de CTV es limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swing), la cual es altamente sensible para la expresión de los síntomas de CTV. Otras plantas indicadoras idóneas para evaluar propiedades biológicas específicas son la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), naranjo agrio, toronja y la combinación de naranja dulce sobre el patrón naranjo agrio. La evaluación de los síntomas en las diferentes plantas indicadoras proporciona evidencias sobre la tipología de los aislamientos presentes en las distintas regiones (Garnsey et al. 1987; Garnsey et al. 1991; Roistacher, 1991).

Numerosos métodos de detección molecular han sido utilizados para diferenciar aislamientos de CTV (Herrera-Isidrón et al. 2009; Rivas-Valencia et al. 2010). La región 3' del genoma del CTV, que incluye el gen de la cápside (CP), el p23 y el p13, aparentemente se han asociado con patogenicidad (Herrera-Isidrón et al. 2009; Albiach-Martí et al. 2010; Hancevic et al. 2013). Las relaciones filogenéticas de variantes de secuencias basadas sobre el gen p23 de un conjunto de aislamientos de CTV separó claramente grupos débiles de severos (Sambade et al. 2003).

Debido a la cronicidad de la infección de CTV, una planta puede exhibir una población de variantes. La expresión de síntomas depende de la estructura poblacional del virus pudiendo variantes moderadas enmascarar el efecto de aislamientos severos. En México, las variantes prevalentes son de tipo moderado

con una condición asintomática. Sin embargo, el rango de variabilidad es bajo con nula presencia de aislamientos severos, por lo menos para la región de la Península de Yucatán (Rivas-Valencia et al. 2010; Domínguez-Monge et al. 2014). A nivel poblacional se ha demostrado que existe una variabilidad espacio-temporal en la estructura de secuencias propiciando cambios de prevalencia pero sin un aparente efecto de variantes de tipo severo aun con la introducción regional del áfido *Toxoptera citricida* (Rivas-Valencia et al. 2010), considerado el más eficiente vector del virus. Sin embargo, estudios de caracterización biológica de estas variantes han sido limitadas lo que dificulta el entendimiento epidemiológico y patogénico del CTV bajo las condiciones de México.

Por otro lado, la condición asintomática natural del CTV y el interés de productores por el uso del naranjo agrio como portainjerto por su adaptabilidad a las condiciones edáficas, climáticas y tecnológicas de México sugiere la factibilidad del uso de la protección cruzada con aislamientos moderados altamente prevalentes. El antecedente de la protección cruzada a nivel comercial está bien documentado en Sudáfrica y Brasil (Van Vuuren et al. 1993; Souza et al. 2002) como estrategia de manejo contra variantes severas de picado de tallo y tristeza (Powel et al. 2003). En este contexto, el objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad del CTV y el comportamiento patogénico de una selección de aislamientos moderados de alta prevalencia previamente identificados bajo condiciones de campo (Rivas-Valencia et al. 2010) como base para la selección de aislamientos para uso en protección cruzada como una alternativa de manejo de esta enfermedad en México.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Selección de aislamientos de CTV

Los aislamientos incluidos en este estudio se seleccionaron de un acervo mantenido en el Colegio de Postgraduados con el criterio de su detección y prevalencia en campo obtenido de estudios previos (Rivas-Valencia et al. 2010). Los aislamientos provinieron de la Península de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas colectados entre 2002-2004 y 2011-2015.

4.3.2. Caracterización molecular de aislamientos del CTV

Extracción de RNA. Se realizó la extracción de ARN y RT-PCR para la amplificación del gen que codifica la CP del CTV. Se usó el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) para la extracción de ARN total de cada muestra (100 mg de hoja fresca), según metodología descrita en Rivas-Valencia et al. (2010).

RT-PCR. Se realizó la RT-PCR usando iniciadores correspondientes al gen CP. Se agregaron 2 μ L de ARN a 25 μ L del volumen final de la mezcla conteniendo 10x PCR buffer, 2.5 mM MgCl₂, 200 Mm de dNTP's, 0.5 μ L (100ng μ L⁻¹) de los iniciadores específicos CPNF 5' ATGGACGACGAAACAAAGAAATTG 3' y CPNR 5' GCTCAACGTGTGTTAA 3' (Narváez et al. 2000), 20 unidades de RNase OUT (InvitrogenTM), 50 unidades de M-MLV transcriptase reverse (InvitrogenTM) y 1.25 unidades de Taq DNA Polymerase (PromegaTM). La transcripción inversa se realizó a 42°C por 40 min y el paso de desnaturalización a 95°C por 5 min. El

programa de amplificación del ADNc se llevó a cabo con 35 ciclos de 2 min a 94°, 2 min a 55°C y 2 min a 72°C, seguido de un periodo de extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de la amplificación (672 pb) se analizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

4.3.3. Análisis de secuencias

Los fragmentos amplificados (CP) de CTV fueron sometidos a secuenciación. Por lo que se purificó y secuenció el producto de RT-PCR (Macrogen Inc. Korea del Sur) con el par de iniciadores específicos del gen. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las publicadas en el GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/). El alineamiento múltiple de las secuencias de los aislamientos de CTV fue realizado con el programa MEGA (Análisis Genético de Evolución Molecular) versión 6 (Thompson et al. 1994; Tamura et al. 2011) utilizando Clustal W. Para construir el árbol filogenético se usó el método *Neighbour-Joining*. La topología del árbol se evaluó por análisis de bootstrap con 1000 repeticiones con el programa MEGA (Felsenstein 1985). Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio fueron depositados en el GenBank bajo los números de acceso: KX029088, KX029089, KX029090, KX029091, KX029092, KX029093, KX029094 y KX029095.

4.3.4. Inoculación de las plantas indicadoras

Las plantas de limón mexicano, naranjo agrio y toronja fueron germinadas a partir de semillas en el vivero certificado “Vivero Cazones” ubicado en el municipio

de Cazones, Veracruz. Cuando las plantas tuvieron un tamaño aproximado de 20 cm, se movilizaron al invernadero de la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV) de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) ubicado en Querétaro, en donde fueron mantenidas a temperaturas de 18 a 24 °C durante 12 meses. Antes de ingresar al invernadero de la ENECUSaV, las plantas se transfirieron a contenedores de plástico de 3L de volumen, llenados previamente con una mezcla esterilizada de sustrato (Peat most®). Las plantas fueron fertilizadas semanalmente y tratadas con insecticida cuando fuese necesario.

Las inoculaciones con material infectado de CTV se realizaron en Febrero de 2015 con 2-3 yemas por plántula de acuerdo al Protocolo de diagnóstico de la Organización Norteamericana de Protección de las Plantas (NAPPO, 2013). Después de la inoculación, las plantas se podaron y solo un brote se dejó crecer. Se estableció un diseño experimental en bloques generalizados con tres repeticiones donde se inoculó por medio de injerto cada aislamiento (2-3 yemas) en las plantas indicadoras: limón mexicano, naranjo agrio, toronja y naranjo dulce sobre naranjo agrio. En cada tratamiento se usó una planta sin inocular como testigo negativo.

4.3.5. PCR en tiempo real para detección de CTV

Todas las plantas fueron evaluadas mensualmente a partir del segundo mes después de la inoculación para la presencia de CTV utilizando PCR en tiempo real.

El análisis de PCR en tiempo real se realizó con el equipo StepOne™ Real-Time PCR Systems Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el método de presencia/ausencia, utilizando los iniciadores P25F-23 (5'- AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC - 3'), P25R-20 (5'- TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA - 3') y la sonda tipo Taqman marcada con FAM (5'- CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G - 3'). La reacción consistió en un programa de termociclaje de 95°C 3min, (95°C 5s, 59°C 40s) 40x y 59°C 35s. La detección del virus se llevó a cabo con los valores de Ct's (ciclo de termociclaje en el cual se rebasó el umbral de fluorescencia estimado automáticamente por el equipo) los cuales se encontraron por debajo de 35 ciclos. Muestras con Ct's mayores a 35 ciclos fueron consideradas negativas según los estándares del equipo.

4.3.6. Evaluación de síntomas

En cada planta indicadora, se monitoreó mensualmente por seis meses la presencia e intensidad de síntomas (amarillamiento, aclaramiento de la nervadura y acucharado de hoja) utilizando una escala arbitraria de 0 a 3, basada en la evaluación visual de la intensidad de los síntomas, en donde 0 significa la ausencia de síntomas, 1 la presencia de síntomas débiles, 2 moderados, y 3 severos (Hancevic et al. 2013). Se dejó crecer un brote lateral en el cual se

realizaron las mediciones y los demás fueron podados de acuerdo a la metodología descrita por Hancevic et al. (2013). Se examinó la presencia de picado de tallo a los seis meses después de la inoculación en el brote lateral. Se evaluó el crecimiento mediante el promedio mensual del alargamiento del brote, la distancia internodal a través del promedio de los cambios mensuales en la longitud del brote dividido por el número de entrenudos, y la cantidad relativa de clorofila mediante la absorbancia de la hoja en dos regiones de longitud de onda con el equipo SPAD 502 plus.

Los datos obtenidos de las evaluaciones de los síntomas se compararon para cada aislamiento de CTV mediante ANOVA ($P \leq 0.05$; usando la prueba de Tukey). El análisis estadístico se realizó con el programa estadístico “R-package” (R Development Core Team, 2009).

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Caracterización molecular de aislamientos de CTV

Los resultados de RT-PCR confirmaron la presencia de CTV en todas las plantas usadas como fuente de inóculo. Todos los aislamientos tuvieron una estructura poblacional consistente en una variante de secuencia predominante (haplotipo) cuya frecuencia fue de 100%. El análisis filogenético de las secuencias mexicanas mostró una clara categorización de variantes de CP en tres grupos bien definidos (Fig. 1). Un solo grupo (1) correspondiente a aislamientos moderados asintomáticos de la Península de Yucatán, Veracruz y Tamaulipas,

mientras que los grupos 2 y 3 correspondieron a aislamientos severos sintomáticos tomados del GenBank. Las ramificaciones de los grupos fueron soportadas por valores de bootstrap altos (Fig. 1).

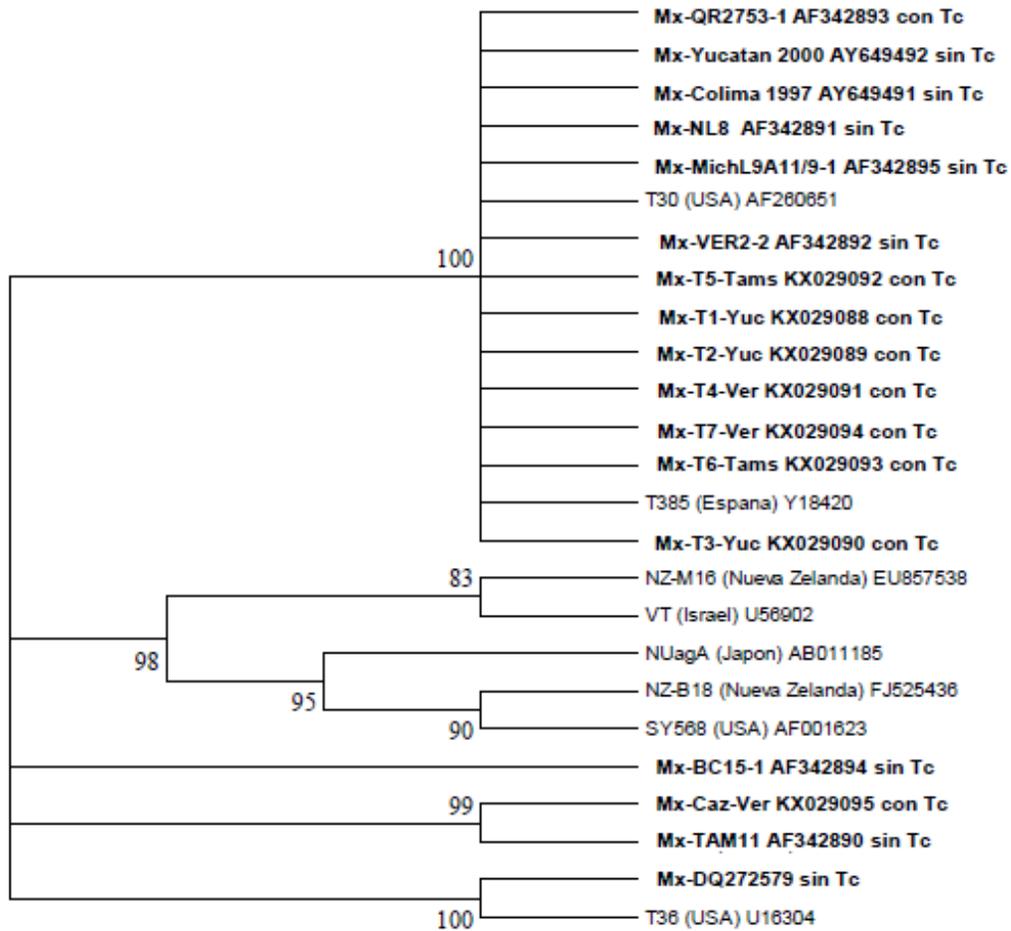


Figura 1. Árbol filogenético de la región genómica CP para 8 aislamientos de CTV. Los árboles fueron generados en MEGA usando el método neighbor-joining. En las ramas se muestra el porcentaje de réplicas de los grupos de aislamientos con la prueba de bootstrap (1000 bootstrap).

4.4.2. Caracterización biológica de aislamientos de CTV

Para asociar los aislamientos de CTV con síntomas específicos, en cada aislamiento se describió la actividad biológica individual. Para ello, los valores promedio del crecimiento de los brotes, de la longitud intermodal y del contenido de clorofila se clasificaron con base en las diferencias observadas entre las plantas testigo y las plantas inoculadas.

Veinte días después de la inoculación, las plántulas comenzaron a producir nuevos brotes. El crecimiento vegetativo de todas las plantas inoculadas continuó su crecimiento durante todo el periodo de evaluación (Abril 2015 a Febrero 2016).

Cuadro 1. Detección de copias de ARN genómico en hoja de plantas indicadoras infectadas con los diferentes aislamientos de CTV por PCR en tiempo real usando el método de presencia/ausencia.

Aislamiento de CTV	$Ct \pm D.E.^a$	CV% ^b
Testigo	38.44 \pm 1.05	0.03
T1-Yuc	25.47 \pm 4.78	0.19
T2-Yuc	26.94 \pm 6.47	0.24
T3-Yuc	23.33 \pm 1.90	0.08
T4-Ver	22.19 \pm 1.09	0.05
T5-Tams	24.15 \pm 2.19	0.09
T6-Tams	26.98 \pm 6.30	0.23
T7-Ver	31.81 \pm 4.57	0.14

^a Ciclo umbral de detección promedio (Ct) y desviación estándar (D.E.) obtenido de las diferentes plantas indicadoras.

^b Coeficiente de variación (CV%) entre las plantas indicadoras.

Los resultados de PCR en tiempo real confirmaron la presencia del virus en todas las plantas indicadoras infectadas con los distintos aislamientos de CTV

(Cuadro 1). En el ciclo umbral de detección (Ct) de cada aislamiento se observó diferencias en la fluorescencia registrada por el aparato que correspondió a diferencias en concentración. El testigo sin inocular, presentó niveles de Ct siempre por arriba de 37 ciclos considerado negativo según los estándares del equipo (Cuadro 1).

4.4.3. Crecimiento, distancia internodal y contenido de clorofila.

Se observaron diferencias ($P \leq 0.05$) en el crecimiento de los brotes (Cuadro 3) y en la longitud intermodal (Cuadro 4) entre las plantas testigo (no inoculadas) y las inoculadas con los aislamientos de CTV. Mientras que en la reducción de unidades clorofila (Cuadro 2), no hubo diferencias ($P \leq 0.05$).

Cuadro 2. Contenido de clorofila (unidad SPAD) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.

Aislamiento	Limón mexicano	Naranja agrio	N. dulce / N. agrio	Toronja
Control	63.67 a	42.72 a	73.45 a	54.63 a
T1	58.47 a	46.81 a	63.78 a	54.61 a
T2	63.16 a	51.37 a	72.58 a	59.16 a
T3	62.35 a	55.36 a	67.84 a	56.18 a
T4	68.60 a	56.07 a	67.00 a	52.03 a
T5	63.33 a	52.63 a	75.85 a	52.78 a
T6	61.08 a	47.93 a	75.35 a	53.04 a
T7	62.55 a	57.11 a	64.43 a	57.26 a

a – Prueba de Tukey con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes en el contenido de clorofila entre las plantas indicadoras del mismo genotipo inoculadas con los aislamientos del grupo 1.

La toronja mostró reducción del crecimiento con la mayoría de los aislamientos evaluados, calculado a partir del valor promedio estadísticamente diferente en relación al testigo (Cuadro 3). Los aislamientos T4-Ver y T7-Ver causaron reducción de crecimiento en dos especies, T1-Yuc y T5-Tams no causaron reducción de crecimiento y el resto de los aislamientos solo afectaron el crecimiento en una de las especies evaluadas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Longitud promedio del brote (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.

Aislamiento	Limón mexicano	Naranja agrio	Naranja dulce / Naranja agrio	Toronja
Testigo	9.88 abc	13.58 ab	20.02 bc	10.44 ab
T1	5.3 c	15.46 a	17.23 cd	8.55 bcd
T2	7.71 abc	13.19 abc	18.2 cd	7.96 cd
T3	12.62 ab	9.80 cd	23.57 ab	9.94 abc
T4	7.51 bc	13.53 abc	13.9 d	6.62 d
T5	9.32 abc	13.45 abc	20.54 bc	11.46 a
T6	8.64 abc	10.22 bcd	19.08 bc	8.12 cd
T7	11.68 abc	7.7 d	19.06 bc	6.64 d

a, b, c, d – Prueba de Tukey con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes en el crecimiento del brote entre las plantas indicadoras del mismo genotipo inoculadas con los aislamientos del grupo 1.

La reacción de acortamiento de entrenudos se observó en los aislamientos T7-Ver (en naranja agrio), T1-Yuc y T4-Ver (en naranja dulce/naranja agrio) y T6-Tams (en toronja), los cuales tuvieron un impacto significativo en la longitud promedio de estas especies evaluadas, mientras que limón mexicano no fue afectado (Cuadro 4).

Cuadro 4. Longitud promedio internodal (cm) de plantas indicadoras inoculadas con aislamientos moderados de CTV pertenecientes a un grupo filogenético.

Aislamiento	Limón mexicano	Naranja agrio	N. dulce / N. agrio	Toronja
Control	1.04 b	1.77 bc	2.65 a	1.51 ab
T1	1.08 ab	1.90 abc	2.31 bc	1.32 bc
T2	1.07 ab	2.21 a	2.43 ab	1.59 ab
T3	1.28 a	1.68 bc	2.5 ab	1.54 ab
T4	0.93 b	1.62 bc	1.98 c	1.65 a
T5	1.25 a	1.67 bc	2.44 ab	1.54 ab
T6	1.12 ab	1.91 ab	2.54 ab	1.17 c
T7	1.30 a	1.25 d	2.41 ab	1.47 abc

a, b, c, d – Prueba de Tukey con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Letras diferentes indican valores estadísticamente diferentes en la distancia internodal entre las plantas indicadoras del mismo genotipo inoculadas con los aislamientos del grupo 1.

4.4.4. Síntomas de acucharado de hoja, aclaramiento de nervaduras, amarillamiento y picado de tallo.

Los síntomas de acucharado de hoja en limón mexicano fueron observados durante todo el periodo experimental (12 meses). Los síntomas resultaron ser poco variables con respecto a la intensidad de reacción en los aislamientos evaluados (Fig. 2).

Los síntomas de aclaramiento de nervadura en limón mexicano aparecieron unos cinco meses después de la inoculación (datos no mostrados). La presencia de síntomas de aclaramiento de nervaduras en las plantas de limón mexicano tuvo una correlación positiva (0.60) con la presencia de síntomas de acucharado de hoja de acuerdo al aislamiento de CTV (Fig. 2). La reacción promedio mayor de ambos síntomas se presentó en las plantas inoculadas con los aislamientos T4-Ver y T6-Tams.

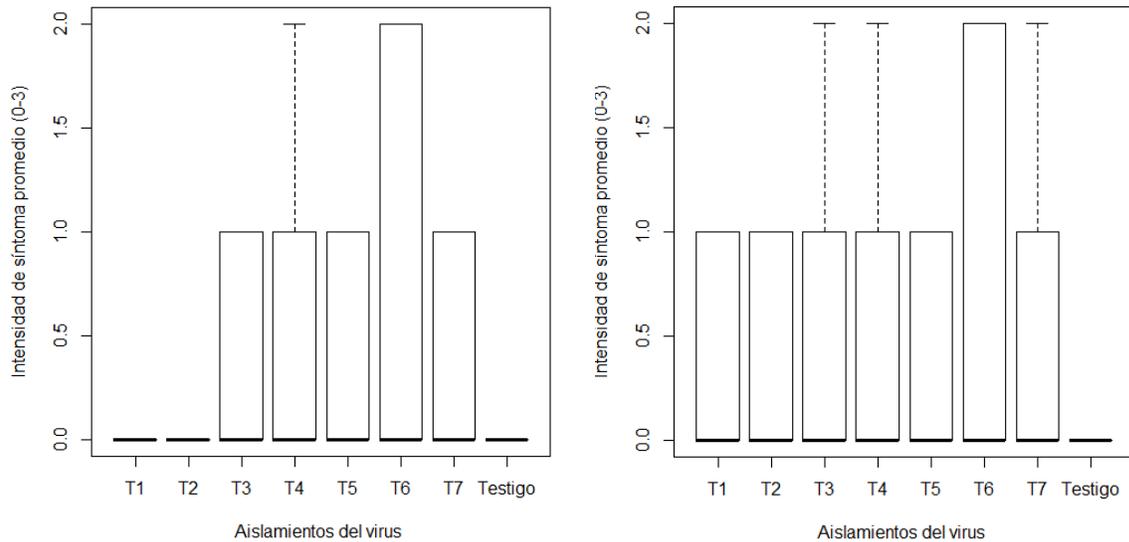


Figura 2. Valores promedio de síntomas de acucharado de hoja (A) y aclaramiento de nervadura (B) en plantas de limón mexicano sin inocular (Testigo) e inoculadas con siete aislamientos de CTV moderados del grupo filogenético G1. a, b, c - Prueba de Tukey con nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Letras diferentes son estadísticamente diferentes en síntomas observados entre plantas testigo e inoculadas.

Los síntomas foliares (amarillamiento) sobre las otras plantas indicadoras aparecieron al final del experimento. El aislamiento T1-Yuc tuvo un efecto en la aparición de síntomas de amarillamiento en plantas de toronja, así como T2-Yuc en la combinación de naranja dulce sobre naranjo agrio.

La presencia de PT se evaluó visualmente siete 7 meses después de la inoculación en los brotes laterales dejados en cada planta. Ninguno de los aislamientos evaluados produjo PT en las plantas indicadoras.

4.5. DISCUSIÓN

Previamente la caracterización molecular de aislamientos mexicanos indicó que son de tipo moderado y asintomáticos (Rivas-Valencia et al. 2010; Domínguez-Monge et al. 2014). Sin embargo, en el caso de CTV es común encontrar múltiples genotipos infectando un solo individuo (Rubio et al. 2001; Weng et al. 2007, Velázquez-Monreal et al. 2009). Basándose en las secuencias del CP, aislamientos mexicanos fueron inoculados en un conjunto de plantas indicadoras (limón mexicano, naranjo agrio, naranja dulce sobre patrón naranjo agrio y toronja), bajo las mismas condiciones ambientales, con la finalidad de monitorear diferencias en síntomas y determinar cualquier variabilidad en las características biológicas de los aislamientos (Hancevic et al. 2013). La utilización de aislamientos virales en protección cruzada requiere garantizar que dicho aislamiento esté libre de variantes severas. En el caso de CTV esto se evalúa con las plantas indicadoras.

Primeramente para separar los aislamientos de CTV débiles y severos, se utilizaron los cambios generados en las plantas inoculadas de limón mexicano catalogadas como especie idónea. La evaluación de las plantas consistió en la presencia de síntomas de aclaramiento de nervadura, acucharado de hoja, picado

de tallo y cambios en su crecimiento. En base a la intensidad de reacción de los síntomas observados, se determinó el tipo de aislamiento de CTV evaluado (Roistacher, 1991; Garnsey et al. 2005).

La presencia de picado de tallo se evaluó también en tallos de naranjo agrio y en plantas de toronja. Adicionalmente, las plantas de toronja se usaron como un indicador de AP en caso de presentarse reducción en el crecimiento, acortamiento intermodal, reducción de clorofila y/o clorosis (McClellan, 1960; Garnsey et al. 2005).

Las plantas de naranjo agrio se utilizaron principalmente para detectar el síndrome AP el cual es inducido por algunos aislamientos de CTV (Roistacher, 1991; Garnsey et al. 2005). Cambios en la reducción del crecimiento, acortamiento de entrenudos, reducción de los niveles de clorofila y clorosis, indican la presencia y severidad de AP (Roistacher, 1991). Esta reportado que el síndrome AP altamente severo puede retrasar completamente el crecimiento de las plantas de naranjo agrio y causar clorosis y reducción de la superficie de las hojas (Suastika et al. 2001).

Las plantas de naranja dulce injertadas sobre naranjo agrio como portainjerto, una combinación altamente prevalente en casi la totalidad de los huertos de cítricos en México, se utilizó para evaluar la capacidad de los aislamientos de inducir retraso en el crecimiento, acortamiento de entrenudos, reducción en la clorofila y clorosis que de manera indirecta indiquen algún daño

inducido por el CTV al obstruir el floema en la unión del injerto el cual está asociado con el síndrome típico de tristeza (Schneider, 1959).

De manera general, las plantas de naranjo agrio, naranja dulce sobre naranjo agrio y toronja infectadas con los aislamientos T7-Ver, T4-Ver y T6-Tams, respectivamente, tuvieron reducción del crecimiento (Cuadro 3) y también presentaron acortamiento de entrenudos (Cuadro 4). En ninguna especie indicadora hubo diferencias en la reducción de las unidades clorofila (Cuadro 2). No se observó la presencia de picado de tallo en las diferentes plantas indicadoras. Síntomas de aclaramiento de nervaduras de los tratamientos T1-Yuc y T2-Yuc fueron ausentes incluso en limón mexicano (Fig. 2). Estudios anteriormente reportados, en donde analizaron las características biológicas de aislamientos (T30 y T385) pertenecientes al genotipo T30 catalogado de tipo moderado, reportan la presencia de síntomas débiles (Ayllon et al. 2001; Garnsey et al. 2005; Hilf et al. 2005; Hancevic et al. 2013), así como en el presente estudio. Así mismo, otras características biológicas evaluadas dentro del genotipo de tipo T30, reportan reducción del crecimiento de plantas de naranjo agrio, naranja dulce sobre naranjo agrio y toronja (Hnacevic et al. 2013), lo cual coincide con los resultados obtenidos. Ninguno de los aislamientos evaluados en este estudio presentaron síntomas de tristeza o picado de tallo. Sin embargo, la intensidad de reacción de algunos síntomas observados en los tratamientos T3-Yuc, T4-Ver, T6-Tams y T7-Ver (Fig. 2) sugiere su asociación con aislamientos que inducen el síndrome de AP.

Este estudio representa el primer intento de analizar la caracterización biológica completa de aislamientos de CTV en México. La evaluación de los siete aislamientos de CTV, previamente obtenidos de campo, mostraron baja patogenicidad al presentar el desarrollo de síntomas débiles como en los aislamientos T1-Yuc, T2-Yuc, T3-Yuc y T5-Tams comparado con T4-Ver, T6-Tams y T7-Ver que mostraron reacciones moderadas, los cuales podrían ser asociados con el síndrome AP.

Considerando la estructura poblacional sencilla y la detección de un solo genotipo en México, estos resultados pueden contribuir significativamente al entendimiento de la variabilidad en las poblaciones de CTV, e incluso pueden influir en el manejo contra el CTV. Por lo tanto, este estudio proporcionará las bases para el establecimiento de un programa de protección cruzada en México.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) (Proyecto: PM09-4002). Los autores agradecen a la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal (ENECUSaV), al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos (GIIC) y al Laboratorio Nacional de Referencia Fitosanitaria (LANREF).

4.6. LITERATURA CITADA

- Albiach-Marti, M.R., Robertson, C., Gowda, S., Tatineni, S., Belliure B, & Garnsey, S.M. (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.
- Ayllon, M.A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Garnsey, S.M., Guerri, J., Flores, R., & Moreno, P. (2001). Polymorphism of the 50 terminal region of Citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Archives of Virology*, 146, 27-40.
- Ballester-Olmos, J. F., Pina, J. A., Carbonell, E. A., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L. (1993). Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42, 219-229.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., & Lee, R.F. (1989). The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 291-316.
- Domínguez-Monge, S., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Ochoa-Martínez, D., Febres, V.J., Hernández-Nava, G., & Martínez-Bustamante, V. (2014). Epidemiología molecular de aislamientos de *citrus tristeza virus* de la Península de Yucatán. *In: Congreso Internacional de Fitopatología*. Del 20-24 de Julio. Ixtapan de la Sal, Estado de México, México.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M.E., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Yokomi, R.K., & Hartung, J.S. (2005). Biological characterization of an international collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. In: *Proceedings of the 16th conference of the international organization of citrus virologists (IOCV)*, Mexico. pp. 75-93.
- Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Yokomi, R.K., & Lee, R.F. (1991). Development of a world wide collection of *Citrus tristeza virus*. In: *Proceedings of 11th Conference of the International Organization of Citrus Virus*. IOCV, Riverside. pp. 113-120.
- Garnsey, S.M., Gumpf, D.J., Roistacher, C.N., Civerolo, E., Lee, R.F., & Yokomi, R.K., et al. (1987). Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*, 19, 151-157.
- Hancevic, K.; Cerni, S.; Nolasco, G.; Radic, T.; Djelouah, K.; Škoric, D. (2013). Biological characterization of *Citrus tristeza virus* monophyletic isolates with respect to p25 gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 81, 45–53.
- 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.E., Mavrodieva, V.A., & Garnsey, S.M. (2005). Genetic marker analysis of global collection of isolates of Citrus tristeza virus: characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology*, 95, 909-917.

- McClellan, A.P.D. (1960). Seedling yellows in South African citrus trees. *South African Journal of Agricultural Science*, 3, 259-279.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiachi-Marti, M.R., Guerri, J., & Peña, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268.
- Narváez, G., Slimane, S. B., Ayllón, M. A., Rubio, L., Guerri, J. & Moreno, P. (2000). A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods*, 85, 83-92.
- Powell, C.A., Pelosi, R.R., Rundell, P.A., & Cohen, M. (2003). Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus* following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease*, 87, 1116-1118.
- R Development Core Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org/>; verified 22 July 2010.
- Rivas, V.P., Loeza, K.E., Mora, A.G., Ruiz, G.N., Ochoa, M.D., Gutiérrez, E.A., Febres, V. (2010). Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1, 493-507.
- Roistacher, C.N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus. In: *Handbook for detection and diagnosis*. Rome: IOCV/FAO.

- Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M.L., Guerri, J., Moreno, P., & Falk, B.W. (2001). Genetic Variation of *Citrus Tristeza Virus* Isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and Recombination. *Journal of Virology*, *75*, 8054-8062.
- Sambade, M., López, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., & Moreno, P. (2003). Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Archives of virology*, *148*, 2325-2340.
- Schneider, H. (1959). The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: Wallace, J.M. (ed). *Citrus virus diseases*. University of California. Riverside, p. 73-84.
- Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas. (2013). Virus tristeza de los cítricos (Citrus Tristeza virus - CTV). Ottawa, Ontario, Canadá.
- Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Leki, H., Okuda, S. (2001). Nucleotide sequence of Citrus tristeza virus seedling yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology*, *67*, 73-77.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Steche, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, *28*, 2731-2799.
- Thompson, J.D., Higgins, D.J., & Gibson, T.J. (1994). CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

- weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680.
- Velazquez-Monreal, J.J., Mathew, D.M., Dodds, J.A. (2009). Segregation of distinct variants from Citrus tristeza virus isolate SY568 using aphid transmission. *Phytopathology*, 99, 1168-1176.
- Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M.E., Dawson, W.O., Galbraith, D.W., & Xiong, Z. (2007). Persistent Infection and Promiscuous Recombination of Multiple Genotypes of an RNA Virus within a Single Host Generate Extensive Diversity. *PLoS ONE*, 2, e917.

**V. DESARROLLO DE UN MODELO DE PREDICCIÓN DE HAPLOTIPOS DE
Citrus tristeza virus EN LA PENSIÑSULA DE YUCATÁN CON SIMULACIÓN
MONTECARLO**

**DEVELOPMENT OF A PREDCITION MODEL FOR *Citrus tristeza virus*
HAPLOTIPES IN THE YUCATAN PENSINSULA WITH MONTE CARLO
SIMULATION**

Santiago **Domínguez-Monge**¹, Gerardo **Acevedo-Sánchez**², Gustavo **Mora-Aguilera**^{1,2}, Emiliano **Loeza-Kuk**³ y Jorge Luis **Flores-Sánchez**¹.

¹Instituto de Fitosanidad y Fruticultura, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ²Laboratorio Nacional de Referencia Epidemiológica Fitosanitaria-Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, C.P. 56230. Texcoco, Estado de México, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias-Campo Experimental-Mocochá, C.P. 97454. Mocochá, Yucatán.

5.1. RESUMEN

La enfermedad conocida como tristeza es una de las más importantes en el cultivo de los cítricos debido a las epidemias que ha causado a nivel mundial. En México, se considera un problema latente, que bajo situaciones extremas podría causar daños severos a la citricultura. Por tal razón, de las variantes de secuencia obtenidas de los 168 aislamientos (Capítulo III), los cuales conformaron 5 haplotipos, se desarrolló un modelo para simular la aparición de nuevos haplotipos de CTV para la Península de Yucatán, región endémica con Tc. El modelo se complementó con datos de 18 huertas (16 Yucatán y 2 Campeche) con antecedentes de la enfermedad usando variables del sistema epidemiológico (%).

de incidencia, edad de huerto, superficie, densidad de plantación, brotes maduros y tiernos, infestación del vector, tipo de riego y temperatura mínima en meses de brotación vegetativa). La predicción del modelo fue obtenida a través de la examinación del coeficiente de correlación de Pearson y por regresión múltiple con el método de Ridge. La selección del modelo fue basada en la proporción de varianza explicada, gráficos de residuos y del factor de inflación de varianza. El modelo ($R^2=0.94$) fue adaptado en MS-Excel al método de simulación Monte Carlo con 5000 iteraciones. En una proyección de 10 años se estimó un total de 11 haplotipos de CTV en el rango de moderados, 6 adicionales a los actualmente presentes en la Península de Yucatán. Estos resultados sugieren una aparente estabilidad de estructura poblacional del CTV en México y el reducido efecto de Tc.

Palabras clave: CTV, epidemiología, modelaje, regresión ridge.

5.2. INTRODUCCIÓN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) (familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*) es el agente causal de la tristeza de los cítricos, considerada una de las enfermedades más destructivas en el cultivo de los cítricos (Bar-Joseph et al. 1989). El CTV ha sido responsable de la muerte de más de 100 millones de árboles durante el siglo pasado (Moreno et al. 2008). Su genoma es monopartita, constituido de una cadena simple de RNA de sentido positivo de aproximadamente 19.3 kb de longitud (Karasev et al. 1995).

Recientemente, en el estado de Campeche se ha detectado y caracterizado molecularmente aislamientos de CTV que indican la presencia de variantes de tipo severo en vector, pero esencialmente, ha predominado la detección de aislamientos de tipo T30 ampliamente distribuido en los estados con producción cítrica y con árboles positivos de la Península de Yucatán (Hernández-Nava et al. 2013). El aislamiento T30 es catalogado como de tipo moderado, pues no induce síntomas en limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) durante la caracterización biológica.

Estudios actuales sobre la estructura poblacional del CTV en el sistema planta-vector muestran la ocurrencia de cambios estructurales de frecuencia de haplotipos, pero dentro del espectro de aislamientos de tipo moderado aun en el escenario epidémico donde *Toxoptera citricida* (Tc) está presente (Domínguez-Monge et al, 2014a, Rivas-Valencia et al, 2010). El conocimiento de la composición poblacional y la detección de haplotipos de CTV, resulta indispensable debido a que puede derivar en el diseño de estrategias de manejo

de la enfermedad, tal es el caso de, inducir una protección cruzada artificial mediante el empleo de aislamientos de alta prevalencia regional (Folimonova, 2013; Souza et al. 2002; Van Vuuren et al. 1993). Sin embargo, estos estudios requieren de varios años de evaluación en campo. En ese contexto, el uso de modelos y estudios de simulación pueden ayudar al entendimiento de los problemas fitosanitarios (Campbell & Madden, 1990). Para esto, se caracterizó molecularmente aislamientos provenientes de árboles positivos en campo y se amplificó la región p25 del genoma del CTV para los análisis de secuencias. Esta metodología se usó para la detección de los haplotipos en campo (Domínguez-Monge et al. 2014), los cuales fueron usados para los estudios de simulación de haplotipos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de predicción de haplotipos del virus de la tristeza de los cítricos basado en variables del sistema epidemiológico (vector, virus, manejo, clima, etc.) en la Península de Yucatán.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Análisis de datos

Para estimar los haplotipos del virus de la tristeza de los cítricos se seleccionaron 18 huertas mediante criterios ponderativos para muestreos restrictivos a focos de la enfermedad en la Península de Yucatán. La matriz de datos seleccionada constó de 12 variables las cuales fueron medidas en los huertos con reportes históricos de la enfermedad (Cuadro 1).

Cuadro 1. Matriz multivariada de 18 huertos seleccionados considerando variables de los subsistemas del sistema epidemiológico.

Mpio.	NoHapl otipos	Inc.	Arb. Enf.	Alt.	Edad	Sup.	Dens. Plant.	B. mad.	B. tiernos	Infes Vector	Rieg	Tmin
Champ.	2	3.78	6	15	3	1	2	89.96	18.36	30.3	0	14.67
Kinchil	2	0.36	1	2	1	2	2	89.93	10.13	47.73	4	15.63
Kinchil	3	1.26	9	10	1	3	4	83.66	10.45	47.73	4	15.63
Kinchil	3	0.25	3	10	1	5	4	61.75	11.56	47.73	4	15.63
Kinchil	2	0.13	1	5	3	3	4	51.19	8	26.69	4	15.63
Samahil	1	0.36	1	9	1	2	2	73.31	0.63	36.21	4	15.49
Samahil	1	0.14	1	7	1	3	4	71.51	10.53	24.93	4	15.47
Samahil	3	0.24	2	13	1	4	4	64.76	13.81	22.89	4	15.46
Dzan	2	0.28	2	30	1	3	4	40.94	9.31	71.19	2	12.59
Dzan	2	0.36	1	30	1	2	2	64.81	9.31	30.39	0	12.48
Dzan	2	0.49	2	34	3	2	4	54.94	3.38	26.52	4	12.44
Dzan	2	0.19	1	34	1	3	3	50.94	20.75	26.52	2	12.44
Dzan	2	2.31	11	34	1	3	2	62.5	33.31	19.11	2	12.35
Ticul	1	0.19	1	28	1	3	3	62.13	25.56	25.7	4	12.3
Ticul	2	1.08	3	30	1	2	2	67.61	7.63	27.06	4	12.3
Ticul	2	0.12	1	35	1	4	4	62.31	9.13	27.06	3	12.3
Muna	1	0.18	1	25	3	4	2	71.81	18.13	6.9	1	13.91
Muna	1	0.21	1	25	1	3	2	68.19	21.44	48.32	1	13.85

5.3.2. Análisis de Correlación de Pearson

Se calculó el coeficiente de correlación para medir la intensidad y forma de la asociación entre las variables (x,y).

$$\text{Coeficiente de correlación} = \frac{\text{Cov}(x,y)}{S_x S_y}$$

El valor que puede asumir el *Coeficiente de correlación* (r_{xy}) se encuentra entre -1 y 1. A medida que r_{xy} se aproxima a 1 o a -1 existe mayor evidencia de que el modelo de regresión, la variable x contribuye de manera significativa a explicar a la variable y (Infante & Zárate 1990).

5.3.3. Estimación de parámetros con el método de Mínimos Cuadrados Ordinarios

Se estimaron los parámetros β_0 y β_1 , lo que equivale a estimar la recta de regresión (Montgomery et al., 2006). Por otra parte, consiste en encontrar la relación de una variable dependiente con un conjunto de variables independientes. Formalmente, dado un conjunto de datos (x_i, y_i) , para $i = 1, \dots, n$, donde $x_i \in \mathbb{R}^p$ y y_i es el valor de salida correspondiente al vector x_i , dada una función $f(x_i, \beta)$, se requiere encontrar el vector de parámetros β , tal que:

$$Y_i = f(x_i, \beta) \quad \text{para } i = 1, \dots, n$$

$$X_i \in \mathbb{R}^{p-1} \quad \beta \in \mathbb{R}^p$$

Dónde:

p : Número de parámetros del modelo

Y donde, Y_i se lee fijando el valor de X_i . En general, la expresión anterior es una aproximación, debido a la variabilidad de los datos del mundo real, una infinidad de factores que se reflejan de cada dato y la incertidumbre de muchas mediciones.

El Método de Mínimos Cuadrados consiste en encontrar los estimadores de β_0 y β_1 , tales que minimicen la suma de cuadrados del error, la cual tiene por expresión:

$$\mu = E y | \beta = E X \beta + \varepsilon = X \beta$$

$$SCE = \varepsilon' \varepsilon = (y - \mu)' (y - \mu)$$

$$\mathbf{y} = \begin{pmatrix} y_1 \\ y_2 \\ \vdots \\ y_n \end{pmatrix} \quad \boldsymbol{\varepsilon} = \begin{pmatrix} \varepsilon_1 \\ \varepsilon_2 \\ \vdots \\ \varepsilon_n \end{pmatrix}$$

$$\boldsymbol{\mu} = \begin{pmatrix} 1 & x_{11} & x_{12} & \dots & x_{1p-1} \\ 1 & x_{21} & x_{22} & \dots & x_{2p-1} \\ 1 & x_{31} & x_{32} & \dots & x_{3p-1} \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 1 & x_{n1} & x_{n2} & \dots & x_{np-1} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \beta_0 \\ \beta_1 \\ \vdots \\ \beta_{p-1} \end{pmatrix}$$

Los elementos del vector $\boldsymbol{\mu}$ están dados por:

$$\mu_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \dots + \beta_{p-1} x_{i,p-1}, i = 1, \dots, n$$

En forma vectorial los parámetros quedan,

$$\mathbf{x}'_j (\mathbf{y} - \boldsymbol{\mu}) = 0, j = 0, 1, 2, \dots, p$$

El sistema de p ecuaciones nos queda,

$$\mathbf{X}'\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} = \mathbf{X}'\mathbf{y}$$

Los valores de $\boldsymbol{\beta}$ que minimizan la SCE viene dada por:

$$\boldsymbol{\beta} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y}$$

$\boldsymbol{\beta}$ es el vector que contiene los estimadores de mínimos cuadrados de los parámetros, además son insesgados, es decir:

$$\begin{aligned} E[\hat{\boldsymbol{\beta}}] &= E[(\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y}] \\ E[\hat{\boldsymbol{\beta}}] &= (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'E[\mathbf{y}] \\ E[\hat{\boldsymbol{\beta}}] &= (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} \\ E[\hat{\boldsymbol{\beta}}] &= \mathbf{I}\boldsymbol{\beta} = \boldsymbol{\beta} \end{aligned}$$

5.3.4. Ajuste del modelo de regresión lineal múltiple

Para las predicciones de los modelos se utilizó el paquete “**car**”, el cual es usado para hacer regresión aplicada en el programa estadístico “R-package” (R Development Core Team, 2009).

Se usó el conjunto de datos del Cuadro 1 que tiene información de los subsistemas del sistema epidemiológico. Los huertos fueron evaluados para las variables: Números de haplotipos, Incidencia, Edad, Superficie, Densidad de Plantación, Brotes tiernos, Infestación del Vector, Riego y Temperatura mínima.

Para el ajuste de los modelos de regresión, se elaboraron 5 modelos a través de las variables obtenidas de la matriz multivariada presentada anteriormente (Cuadro 2).

5.3.5. Análisis de varianza

Conjuntamente, se realizó un análisis de varianza para conocer si los parámetros tienen un efecto significativo para la estimación del número de haplotipos del virus (Castillo, 2006).

Cuadro 2. Ecuaciones de regresión de los modelos lineales.

Modelo	Ecuación del modelo
Modelo 1	$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_5 X_5 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 + \beta_9 X_9 + \varepsilon$
Modelo 2	$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \varepsilon$
Modelo 3	$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_7 X_7 + \beta_8 X_8 + \beta_9 X_9 + \varepsilon$
Modelo 4	$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_4 + \beta_6 X_6 + \beta_7 X_7 + \varepsilon$
Modelo 5	$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_3 X_3 + \beta_7 X_7 + \varepsilon$

5.3.6. Análisis de residuos

Adicionalmente, se realizó un análisis de residuos para ver que se cumpliera con los supuestos de normalidad y de varianza homocedástica. Para lo cual, se solicitaron gráficos de residuos (Castillo, 2006).

5.3.7. Detección de multicolinealidad

Para detectar multicolinealidad en los datos se utilizó el *Factor de Inflación de Varianza* (VIF) (Draper & Smith, 1981; Freud & Littell, 1985). El procedimiento para calcular los VIF se muestra a continuación:

- a) Se ajustó el modelo de regresión lineal múltiple con *NoHaplotipos* como variable dependiente y el resto de las covariables como explicatorias.
- b) Se calculó el VIF asociado a la variable con la siguiente ecuación:

$$VIF = \frac{1}{1 - R^2_j}$$

- c) La regla de decisión fue, si $VIF > 5$, entonces existen problemas de multicolinealidad.

5.3.8. Estimación de Parámetros con Regresión Ridge

La Regresión Ridge busca estimar nuevos parámetros del modelo minimizando la varianza de los mismos (Faraway, 2009); los estimadores Ridge a diferencia de los estimadores por mínimos cuadrados son sesgados. La Regresión Ridge es la que presenta mayor regularidad en el proceso de estimación y debido a esto es más atractivo su uso. Suponiendo que se puede determinar un estimador sesgado de β denotado por β_r (Estimador Ridge), que tenga menor varianza que el estimador insesgado β . El error cuadrático medio del estimador β_r se denota:

$$ECM(\hat{\beta}_R) = \text{Var}(\hat{\beta}_R) + [E(\hat{\beta}_R) - \beta]^2$$

es decir

$$ECM(\hat{\beta}_R) = \text{Var}(\hat{\beta}_R) + (\text{sesgo de } \hat{\beta}_R)^2$$

El *Error Cuadrático Medio (ECM)* no es más que la distancia esperada, de β_R a β , elevada al cuadrado. Nótese que si se permite una pequeña cantidad de sesgo en β_R , la varianza de β_R se puede hacer pequeña, de tal modo que el error cuadrático medio de β_R sea menor que la varianza del estimador insesgado β .

Denotamos al estimador de Mínimos Cuadrados en forma matricial.

$$\beta = (X'X)^{-1}X'y$$

Se han desarrollado varios procedimientos para obtener estimadores sesgados de coeficientes de regresión. Uno de esos procedimientos es la Regresión Ridge (o de la cresta), propuesta originalmente por Hoerl y Kennard (1960). En forma específica, el estimador de ridge β_R se define como la solución de:

$$(X'X + kI) \beta_R = X'y$$

Qué es:

$$\beta_R = (X'X + kI)^{-1}X'y$$

Dónde k es una constante positiva, nótese que cuando $k=0$ el Estimador Ridge es igual al Estimador por Mínimos Cuadrados.

5.3.9. Simulación Monte Carlo en MS Excel

A través de la integración de la matriz multivariada generada, se integró en MS Excel 2010, un modelo de simulación de haplotipos a nivel regional basado en el sistema de simulación Monte Carlo (N=5000) (Wittwer, 2004), el cual se nombró *CTV-H@plotipe v1.0*.

CTV-H@plotipe v1.0 se desarrolló como un sistema dinámico interactivo de variables de los subsistemas del sistema epidemiológico para la simulación del número de haplotipos de CTV en el cultivo de cítricos.

5.3.9.1. Parámetros Epidemiológicos

Los parámetros epidemiológicos empleados para realizar las simulaciones Monte Carlo (MC) fueron los siguientes:

- Incidencia de la enfermedad (%) (IAr)
- Infestación del vector (%) (IVe)
- Edad de la plantación (Ed)
- Densidad de plantación (m²) (Dp)
- Superficie de la parcela (ha) (Ss)
- Brotes maduros (No.) (Bm)
- Brotes tiernos (no.) (Bt)
- Tipo de riego (TRi)
- Temperatura mínima (°C) (Tmin)

5.3.9.2. Simulación Monte Carlo

Los parámetros epidemiológicos de estimación para la región se adaptaron en MS-Excel para realizar 5000 simulaciones estadísticas por el método Monte Carlo.

La fórmula general empleada para la simulación MC se define a continuación:

$$NoHap = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_5X_5 + \beta_6X_6 + \beta_7X_7 + \beta_8X_8 + \beta_9X_9 + \varepsilon$$

Dónde:

$NoHap$ = Número de haplotipos

β_0 y β_i = Parámetros de la regresión

X_i = Covariables del modelo

ε = Error

Las 5000 simulaciones se realizaron mediante números aleatorios de los parámetros IAr, IVe, Ed, Dp, Ss, Bm, Bt, TRi y Tmin y se calcularon con base en los intervalos de confianza ($\alpha=5\%$) de cada variable derivados del procedimiento *INTERVALO.CONFIANZA* en Excel.

5.3.9.3. Representación gráfica de la simulación MC

Las 5000 simulaciones realizadas a través del modelo MC para la estimación del *Número de Haplotipos* se graficaron por medio de histogramas de frecuencias para determinar la forma de distribución de los datos. El procedimiento utilizado fue a través de la siguiente función de MS Excel:

$$Freq = Frecuencia(Datos, grupo)$$

Dónde:

Datos = 5000 simulaciones

Grupo = clases

Para fines representativos, el número de clases empleado fue el número mínimo del conjunto de datos. Las clases se determinaron a través de la siguiente fórmula:

$$Clase\ 0 = Min(datos)$$

$$Clases = \frac{Min(datos) - Max(datos)}{N} + Clase\ 0$$

Dónde:

Min = función de Excel para determinar el valor mínimo

Max = función de Excel para determinar el valor máximo

Datos = 5000 simulaciones

N = número deseado de clases

5.3.9.4. Estadística Descriptiva y Probabilidad

Como parte de las simulaciones MC se generaron un conjunto de estadísticas descriptivas y probabilidades asociadas a las simulaciones. A continuación se enlistan las herramientas empleadas:

- Tendencia Central
 - Media, mediana y error estándar
- Dispersión
 - Desviación estándar, mínimo, máximo, rango (máximo – mínimo), cuartil 25% y 75% y Rango intercuartil (cuartil 25% - cuartil 75%).
- Cuantiles, percentiles e intervalos

- Percentil 5, 25, 95 y 97.5%, Percentil $\alpha/2$, Percentil $1 - \alpha/2$ ($\alpha = 5\%$).
- Probabilidades. Apartado dinámico, en el que el usuario coloca los valores de los cuales requiere saber su probabilidad.
 - Probabilidad mayor. Devuelve la probabilidad de un número mayor al indicado ($Pr > num$).
 - Probabilidad menor. Devuelve la probabilidad del número menor al indicado ($Pr > num$).
 - Probabilidad rango. Devuelve la probabilidad de un rango de datos indicado ($Pr < num >$).

5.3.9.5. Variables Respuesta

a. Número de árboles totales por hectárea

Corresponde al número total de plantas de la huerta por hectárea de acuerdo a su densidad de plantación. Se calcula de la siguiente forma:

$$Nar == (100/IZQUIERDA(Dp)) * (100/DERECHA(Dp))$$

b. Número de árboles totales por superficie del huerto

Corresponde al número de plantas totales de acuerdo a la densidad de plantación y de la superficie del huerto. Se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{Nar}{sup} = Nar * Superficie sembrada$$

c. Número de árboles enfermos

El número de árboles enfermos por hectárea de acuerdo al porcentaje de incidencia y el número de árboles totales, se calcula de la siguiente forma:

$$Nae = Nar * \% incidencia$$

d. Índice de compactación citrícola

Corresponde a la densidad de plantación entre la superficie del huerto, se calcula de la siguiente forma:

$$Icc = 1 - \frac{Dp}{Ss}$$

e. Índice de brotación

Corresponde al número de brotes tiernos entre el número total de brotes (maduros y tiernos) contabilizados en el árbol, se calcula de la siguiente forma:

$$Ibr = Bt / (Bt + Bm)$$

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Coeficientes de correlación de Pearson

Se examinó la intercorrelación entre la variable dependiente y las variables independientes usando la matriz de autocorrelación. Todas las variables independientes fueron correlacionadas significativamente con el incremento de la incidencia de la enfermedad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Matriz de correlación de variables dependiente e independientes usada en análisis de regresión para relacionar el número de haplotipos de *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán.

	NoHap.	Inc.	A.Enf.	Altitud	Edad	Sup.	D. Pl.	B. Mad.	B. Tier.	I. Vec.	Riego	Tmin
NoHap.	1	0.181	0.419	-0.142	-0.112	0.250	0.448	-0.028	-0.146	0.250	0.211	0.205
Inc.	0.1817	1	0.743	0.020	0.277	-0.501	-0.363	0.462	0.346	-0.092	-0.388	-0.016
A. Enf.	0.419	0.743	1	0.042	-0.030	-0.095	-0.081	0.270	0.417	0.008	-0.092	0.008
Altitud	-0.142	0.020	0.042	1	-0.053	-0.001	-0.134	-0.512	0.332	-0.202	-0.408	-0.966
Edad	-0.112	0.277	-0.030	-0.053	1	-0.222	0.000	0.031	-0.097	-0.387	-0.213	0.088
Sup.	0.250	-0.501	-0.095	-0.001	-0.222	1	0.503	-0.357	0.174	-0.042	0.229	0.126
D.Pl.	0.448	-0.363	-0.081	-0.134	0	0.503	1	-0.455	-0.319	0.201	0.523	0.181
B. Mad.	-0.028	0.462	0.270	-0.512	0.031	-0.357	-0.455	1	0.004	-0.075	-0.058	0.496
B. Tier.	-0.146	0.346	0.417	0.332	-0.097	0.174	-0.319	0.004	1	-0.273	-0.402	-0.306
I. Vec.	0.250	-0.092	0.008	-0.202	-0.387	-0.042	0.201	-0.075	-0.273	1	0.060	0.171
Riego	0.211	-0.388	-0.092	-0.408	-0.213	0.229	0.523	-0.058	-0.402	0.060	1	0.349
Tmin	0.205	-0.016	0.008	-0.966	0.088	0.126	0.181	0.496	-0.306	0.171	0.349	1

La correlación entre las variables *Árboles enfermos-Incidencia* (0.743) y *Altitud-Tmin* (-0.966) es alta, por lo que podría presentarse un problema de multicolinealidad en un modelo que contenga estas variables. En las otras variables, no se observa ningún comportamiento anormal.

5.4.2. Matriz de diagramas de dispersión

En la matriz de los diagramas de dispersión no se observa un patrón aglomerado indicando buena dispersión de los datos, por lo que se espera que la correlación entre las variables sea significativa y sin problema de multicolinealidad, uno de los supuestos importantes de regresión lineal múltiple en la que se dice que las variables son independientes (Figura 1).

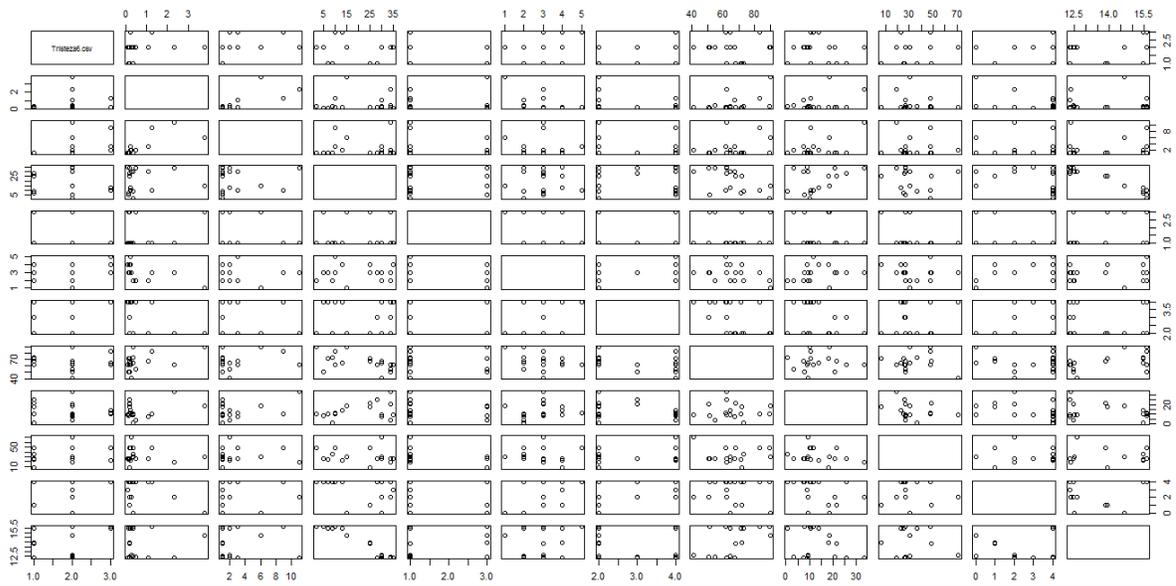


Figura 1. Matriz de diagramas de dispersión de las variables y covariables usadas en el análisis de regresión para relacionar el número de haplotipos de *Citrus tristeza virus* en la Península de Yucatán.

5.4.3. Estimación de parámetros con el método de MCO

La estimación de los parámetros muestra los datos para $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_9$, cuyos valores se muestran en las ecuaciones de regresión lineal múltiple en el Cuadro 4. El parámetro para β_0 (Intercepto) no fue estimado.

5.4.4. Análisis de varianza

El valor de β_1 está relacionado con la *Incidencia* en los huertos muestreados, el coeficiente positivo significa que si la incidencia de la enfermedad

aumenta, entonces el número de haplotipos de CTV también aumenta. Representa también el cambio que ocurre en el número de haplotipos ante un cambio de la incidencia cuando las otras covariables están fijas (Cuadro 5).

Cuadro 4. Estimación de los parámetros de los modelos de regresión.

Modelo	Estimación de los parámetros de regresión
Modelo 1	NoHaplotipos= ((0.5319*incidencia_arb) - (0.1581*edad) + (0.3271*superficie_sem) + (0.2354*densidad_2) - (0.002*brotos_maduros) - (0.0275*brotos_tiernos) + (0.0046*(infestacion_vect*virulificidad)) + (0.0105*tipo_riego) + (0.0311*temperatura_min))
Modelo 2	NoHaplotipos= ((0.4264*incidencia_arb) - (0.1447*edad) + (0.1942*superficie_sem) + (0.4136*densidad_2))
Modelo 3	NoHaplotipos= ((0.3809*incidencia_arb) + (0.2127*superficie_sem) + (0.2456*densidad_2) + (0.0103*infestacion_vect) + (0.0696*tipo_riego) + (0.0179*temperatura_min))
Modelo 4	NoHaplotipos= ((0.5389*incidencia_arb) - (0.1239*edad) + (0.3638*superficie_sem) + (0.2626*densidad_2) - (0.0273*brotos_tiernos) + (0.0069*infestacion_vect))
Modelo 5	NoHaplotipos= ((0.3535*incidencia_arb) + (0.3876*superficie_sem) + (0.0159*infestacion_vect))

Por otra parte, el valor de β_2 , β_3 y β_4 , está relacionado con la *Edad*, la *Superficie* y la *Densidad de plantación*, respectivamente, siendo el coeficiente positivo, lo que significa que si estas tres covariables aumentan, entonces el número de haplotipos del CTV también tendería a aumentar.

Cuadro 5. Análisis de Varianza de los modelos de regresión.

Variable	Pr(>F)				
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4	Modelo 5
Incidencia	0.00002***	0.0000004***	0.000002***	0.000001***	0.0000005***
Edad	0.00006***	0.000001***	-	0.000003***	
Superficie	0.00012***	0.000003***	0.0000002***	0.000008***	0.00000003***
D. de Plantación	0.04579*	0.01933*	0.03656*	0.02088*	-
Brotos maduros	0.62890	-	-	-	-
Brotos tiernos	0.29783	-	-	0.23190	-
Infest. del vector	0.64303	-	0.36034	0.46051	0.07754 ‘.’
Riego	0.90060	-	0.65540	-	-
Tº mínima	0.84809	-	0.76526	-	-

Significancia: ‘***’ 0.001; ‘**’ 0.01; ‘*’ 0.05; ‘.’ 0.1

5.4.5. Gráficos de residuos

La Figura 2 ilustra de manera general el análisis de los residuos con los cuales se realizó la comprobación de los supuestos. La homocedasticidad se comprobó con la columna de la Figura 2A al no observarse un patrón de distribución de los residuales vs valores ajustados para los cinco modelos. En la columna de la Figura 2B se observa claramente para los cinco modelos una línea de tendencia en el gráfico Normal Q-Q, lo cual indica normalidad en la distribución de los residuos.

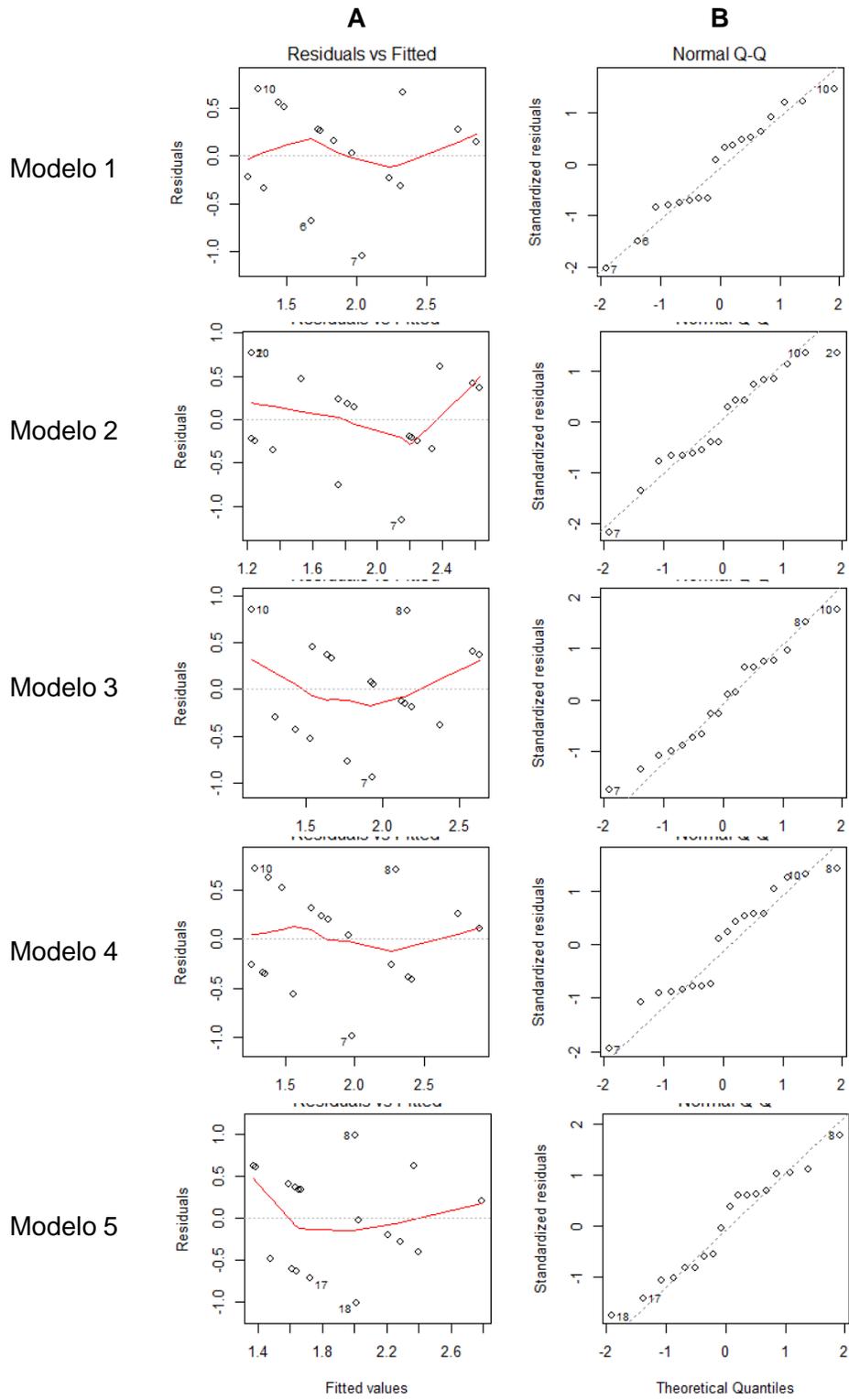


Figura 2. Gráficos de residuos para comprobación de supuestos de normalidad y homocedasticidad.

5.4.6. Detección de multicolinealidad

En los datos analizados se detectó problemas de multicolinealidad, debido a que los (VIF) para las covariables *Edad*, *Superficie*, *Densidad de Plantación*, *Brotos tiernos*, *Brotos maduros*, *Infestación del Vector*, *Riego* y *Temperatura mínima* son mayores que 5 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cálculo del Factor de Inflación de Varianza

Variable	Factor de Inflación de Varianza
Incidencia	3.8113845
Edad	7.564950
Superficie	29.981782
D. de Plantación	30.725444
Brotos maduros	84.696595
Brotos tiernos	6.980363
Infest. del vector	10.850445
Riego	10.174452
T° mínima	204.435282

5.4.7. Regresion Ridge

Debido al problema de multicolinealidad detectada en la estimación de los parámetros con el método de Mínimo Cuadrado Ordinario, se realizaron nuevos modelos pero ahora empleando el método **ridge**, el cual como ya se ha mencionado, inducirá sesgo pero reducirá la varianza y robustecerá las estimaciones de los regresores.

Se probaron diversos valores de k (= lambda) en las diferentes estimaciones de los modelos, reteniéndose una $k=0.10$, valor a partir del cual se estabilizaron las estimaciones (Figura 3).

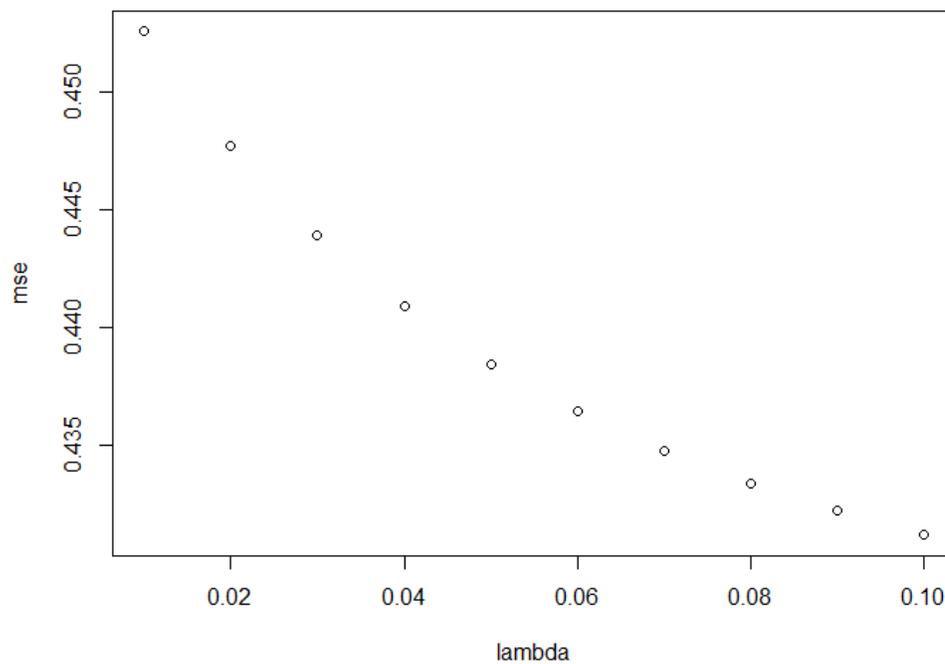


Figura 3. Gráfica de relación entre el cuadrado medio del error (mse) y lambda, para selección del mejor valor a usar en modelo ridge.

Con base en lo anterior, se obtuvieron los siguientes estimadores de los regresores (Cuadro 7). Los cuales corrigen el problema de multicolinealidad y la viabilidad del uso de los modelos con fines de pronóstico de haplotipos para el virus de la tristeza de los cítricos.

La estimación de los parámetros, muestra los datos para β_{R1} , β_{R2} , ..., β_{R9} , cuyos valores se muestran en las ecuaciones de regresión lineal múltiple del Cuadro 7.

Cuadro 7. Estimación de los parámetros de los modelos de regresión con el método ridge.

Modelo	Estimación de los parámetros de regresión
Modelo 1	NoHaplotipos= ((0.5775) + (0.5399*incidencia_arb) -(0.1737*edad) + (0.3245*superficie_sem) + (0.2122*densidad_2) - (0.0037*brotos_maduros) - (0.031*brotos_tiernos) + (0.0036*(infestacion_vect*virulifidad)) + (0.0128*tipo_riego) + (0.0097*temperatura_min))
Modelo 2	NoHaplotipos= ((0.3537) + (0.3787*incidencia_arb)-(0.171*edad) + (0.1389*superficie_sem) + (0.3765*densidad_2))
Modelo 3	NoHaplotipos= (-0.4212) + (0.3849*incidencia_arb) + (0.2201*superficie_sem) + (0.2537*densidad_2) + (0.0104*infestacion_vect) + (0.0621*tipo_riego) + (0.0098*temperatura_min))
Modelo 4	NoHaplotipos= ((0.4193) + (0.5147*incidencia_arb) - (0.1703*edad) + (0.3205*superficie_sem) + (0.2426*densidad_2) - (0.0302*brotos_tiernos) + (0.0038*infestacion_vect))
Modelo 5	NoHaplotipos= ((0.1947) + (0.3248*incidencia_arb) + (0.347*superficie_sem) + (0.0144*infestacion_vect))

5.4.8. Simulación Monte Carlo en Excel

El análisis de simulación mostró que en un tiempo de proyección de 10 años, la aparición de nuevos haplotipos será de 11 haplotipos (Figura 4).

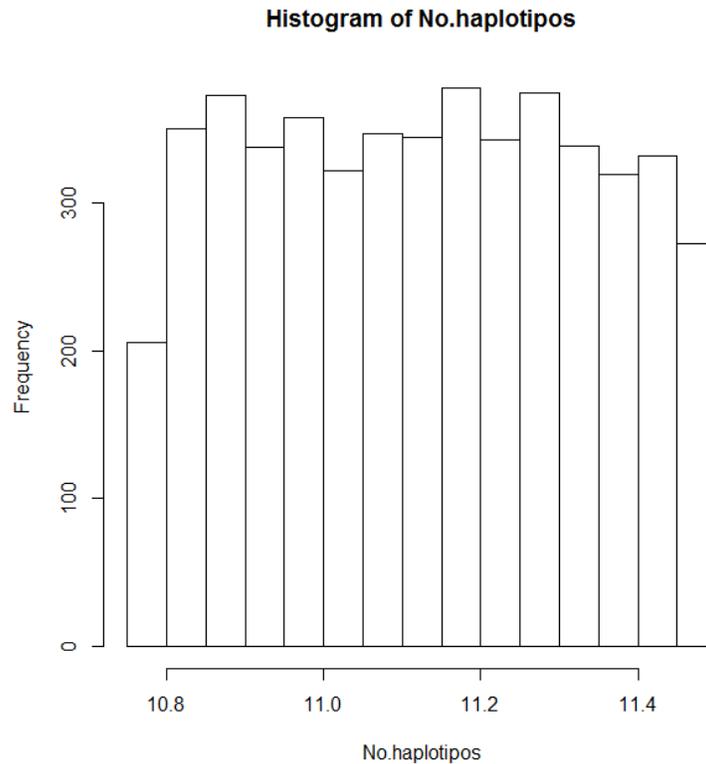


Figura 4. Número de haplotipos totales de *Citrus tristeza virus* en cítricos, usando simulación Montecarlo.

5.5. DISCUSIÓN

La estimación del número de haplotipos es un elemento importante en la planeación y toma de decisiones dentro del manejo de la enfermedad. Para ello, predecir las subpoblaciones de aislamientos de CTV en el cultivo de cítricos, puede así mismo justificar la importancia de estimar riesgos de cambios de frecuencia contundentes a alteraciones a los atributos epidémicos y, por otra parte, la conveniencia de seleccionar aislamientos moderados de manera eficiente para efectos de inducir una protección cruzada mediante el empleo de aislamientos de alta prevalencia regional como una estrategia de manejo de la

enfermedad. Además, el uso de modelos pueden ser usados para propuestas de nuevos enfoques de monitoreo dentro de un esquema de vigilancia epidemiológica que incluya sistemas de muestreo ponderativos regionales.

5.6. LITERATURA CITADA

- Bar-Joseph, M., Marcus R., Lee, R.F. 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. Annual Review Phytopathology 27:291-316.
- Campbell, C. L. e Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. New York. John Wiley. 532 pp.
- Castillo, ML.E. 2006 Introducción a la estadística experimental. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Tercera edición.
- Domínguez-Monge, S, Mora-Aguilera, G, Loeza-Kuk, E., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G., Ochoa-Martínez, D., Febres, V.J., Hernández-Nava, G., y Martínez-Bustamante, V. 2014a. Epidemiología molecular de aislamientos de *citrus tristeza virus* de la Península de Yucatán. In: Congreso Internacional de Fitopatología. Del 20-24 de Julio. Ixtapan de la Sal, Estado de México, México.
- Domínguez-Monge, S, Mora-Aguilera, G, Loeza-Kuk, E., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Ochoa-Martínez, D., Febres, V.J. 2014b. Epidemiología molecular de aislamientos de *citrus tristeza virus* de la Península de Yucatán. In: Avances de investigación 2014. Del 20-21 de Noviembre. Posgrado en Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Estado de México, México.
- Draper, N.R., & Smith, H. 1981. Applied Regression Analysis. 2nd ed. John Wiley & Sons, New York.
- Faraway, J.J. 2009. Linear Models with R. Chapman & Hall. Boca Ratón London. New York, Washington, D.C.

- Folimonova, S.Y. 2013. Developing an understanding of cross-protecting *Citrus tristezza virus*. *Front Microbiol* 4:1-9.
- Freud, R.J., & Littell, R.C. 1985. SAS System for Regression. SAS Institute, Cary, NC.
- Hernández N. G. 2013. Prevalencia de *Toxoptera citricida* y tasa de adquisición del *Citrus tristezza virus* en la Península de Yucatán. Tesis MC. COLPOS. Montecillo, Mex.
- Infante, G.S & Zárata, G.P. 1990. Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. 2ª ed. Trillas.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nokolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the *Citrus tristezza virus* RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Montgomery, D.C, Peck, E.A., & Vining, G. 2006. Introducción al Análisis de Regresión Lineal. Jolm Wiley & Sons, Inc.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiachi-Marti, M.R., Guerri, J., Peña, L. 2008. *Citrus tristezza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9(2): 251-268.
- Rivas, V. P., Loeza, K. E., Mora, A. G., Ruiz, G. N., Ochoa, M. D., Gutiérrez, E. A., Febres, V. 2010. Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristezza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1: 493-507.

-
- Souza, A. A., Müller, G. W., Targón, M. L. P. N., Takita, M. A. and Machado, M. A. 2002. Stability of the mild protective „PIAC“ isolate of citrus tristeza virus. In: Proceeding of the 15th Conference of IOCV. Riverside, CA. Pp. 131-135.
- Van Vuuren, S. P., Collins, R. P., and Da Graca, J. V. 1993. Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. Plant Disease 50:112-116.
- Wittwer, J.W. 2004. [Monte Carlo Simulation in Excel: A Practical Guide](http://www.vertex42.com/ExcelArticles/mc/).
<http://www.vertex42.com/ExcelArticles/mc/>
- R Development Core Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.r-project.org/>; verified 22 July 2010.

VI. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

El análisis de la estructura poblacional del CTV realizado en cítricos dulces de diferentes estados mexicanos de la vertiente del Golfo y de la Península de Yucatán con respecto a antecedentes epidémicos, presencia de *Toxoptera citricida*, vector altamente efectivo y putativamente selectivo de variantes de tipo severo y la prevalencia de aislamientos moderados, permitió determinar la variabilidad genética y patogénica del CTV. Este trabajo permitió establecer las bases metodológicas para estudios epidemiológicos poblacionales con criterios moleculares y biológicos, que permitan monitorear riesgos epidémicos en regiones específicas del país o para selección de aislamientos moderados prevalentes para posible uso en protección cruzada. Específicamente, la implicación de *Toxoptera citricida*, al estudio de la variación genética del CTV permitió poner en manifiesto lo siguiente:

1. Aparentemente Tc no ha inducido cambios estructurales en la población del virus ya que: i) el patrón de divergencia del ARN genómico de los aislamientos analizados tienen una elevada identidad nucleotídica con la de los aislamientos reportados antes de la introducción y dispersión del vector en México, ii) que los genes p33, CP y p13 del extremo 3' son más conservados y han estado bajo selección negativa en el proceso evolutivo, y iv) que existe una prevalencia de aislamientos mexicanos moderados con una homología mayor a 99% para estos genes.
2. La secuencia del ARN genómico del aislamiento mexicano de CTV Caz-Ver (KX029095), mostró elevada identidad nucleotídica con los aislamientos

severos de México (TAM11 y DQ272579) y otros países (NZ-B18, NUagA y SY568), inductores de decaimiento, picado de tallo y amarillamiento de plántulas.

3. Los 7 aislamientos mexicanos (Yucatán 3, Veracruz 2 y Tamaulipas 2) del grupo moderado previamente identificados y caracterizados molecularmente con base en la frecuencia de los estudios poblacionales, tipología de reacción y distribución regional, no presentaron síntomas de tipo severo.
4. Se desarrolló un modelo de simulación que utiliza variables del sistema epidemiológico a través de un sistema dinámico de análisis cuantitativo de multicriterios, el cual estimó 11 haplotipos de CTV moderados, 6 adicionales a los actualmente presentes en la Península de Yucatán, sugiriendo una aparente estabilidad de la estructura poblacional del CTV en México y un reducido efecto de Tc.
5. Como perspectivas futuras se tiene: i) una base de datos de aislamientos mexicanos y de secuencias moleculares para estudios futuros de diagnóstico y trazabilidad y, ii) un acervo de aislamientos de CTV identificados molecular y biológicamente mantenidos en la Estación Nacional de Cuarentena, Epidemiología y Saneamiento Vegetal dependiente de la DGSV en Querétaro para hacer la validación de los 7 aislados moderados (T1-Yuc, T2-Yuc, T3-Yuc, T4-Ver, T5-Tams, T6-Tams y T7-Ver) y evaluar su capacidad de protección cruzada.