



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**  
POSTGRADO EN FITOSANIDAD  
FITOPATOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y  
BIOLÓGICA Y EFECTO EPIDEMIOLÓGICO DE  
AISLAMIENTOS DE CTV EN LOS ESTADOS DE  
LA PENÍNSULA DE YUCATÁN**

**SANTIAGO DOMÍNGUEZ MONGE**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: **Caracterización molecular y biológica y efecto epidemiológico de aislamientos de CTV en los estados de la Península de Yucatán**, 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:

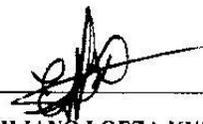
**MAESTRO EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:   
DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESOR:   
DR. EMILIANO LOEZA KUK

ASESOR:   
DRA. PATRICIA RIVAS VALENCIA

ASESOR:   
DR. NOÉ RUIZ GARCÍA

ASESOR:   
DR. GABRIEL DÍAZ PADILLA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Septiembre 2011.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios de Maestría.

A SENASICA-DGSV (Proyecto PM-4002), por el financiamiento de esta investigación.

A los Comités Estatales de Sanidad Vegetal de Yucatán, Campeche y Quintana Roo por el apoyo logístico

Al Dr. Gustavo Mora Aguilera por su apoyo en la dirección, planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

Al Dr. Emiliano Loeza Kuk por su apoyo y orientación en las estancias de campo en la Península de Yucatán.

A la Dra. Patricia Rivas Valencia por su apoyo y orientación en la fase de los estudios moleculares.

Al Dr. Noé Ruiz García por su apoyo y orientación en los muestreos y análisis estadísticos.

Al Dr. Gabriel Díaz Padilla por la orientación en el análisis de datos climáticos para estudios regionales.

A Gerardo Acevedo Sánchez y Noemí de la Rosa por el apoyo técnico y administrativo en el desarrollo de la investigación.

A Edwin Catarino Hernández Chan y a miembros del GIIIC por el apoyo en planeación

## DEDICATORIA

**A mi hija:** Dailín Desireé Domínguez Herrera

**A mi esposa:** Dora María Herrera Ante

**A mis padres:**

Elpidia Monge Ornelas

Ponciano Domínguez Grajales

## RESUMEN

El *Citrus tristeza virus* (CTV) implicó una intensa Campaña Fitosanitaria desde su detección en 1993 hasta el 2008 bajo el sustento de la norma NOM-031-FITO-2000. El antecedente devastador del virus en otros países sugiere mantener su vigilancia epidemiológica para manejo del riesgo. Este trabajo tuvo como propósito cuantificar la situación epidemiológica del CTV en la Península de Yucatán a 11 años del ingreso de *T. citricida* (TC), vector eficiente en dispersión y selección de razas severas. Se integraron datos históricos de 1999-2008, con evaluaciones en 2010-2011 en 34 parcelas seleccionadas en Yucatán, Campeche y Quintana Roo con criterios ponderativos. Por huerto se definió variedad, edad, patrón, densidad, pedregosidad, riego, datos climáticos y síntomas putativos a razas severas. Adicionalmente, siete parcelas (1-2 ha) se censaron mediante inmunopresión-ELISA. Los análisis de datos incluyeron a nivel parcela la aplicación al modelo de Weibull, y el cálculo de parámetros de intensidad epidémica ( $yf$  y Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad –ABCPE-); y a nivel regional se aplicaron técnicas multivariadas a la matriz conformada con 34 parcelas y 12 variables. A partir de componentes principales se constituyeron dos índices multivariados los cuales se emplearon en la generación de mapas interpolados con ArcGis ver 9.2. Hasta 2008, la incidencia a nivel peninsular fue 0.00005%, siendo Yucatán y Campeche los que presentaron mayor número de positivos (1791, 1139) y municipios afectados (21). No se encontraron síntomas de picado de tallo o declinamiento. En 2010-2011, el rango de incidencia fue 0.6-36%, con mayor intensidad en Dzan, Kinchil, Samahil (Yucatán). Los parámetros epidémicos fueron mayores en Yucatán ( $1/b=0.017-0.030$ ,  $p=0.05$ ;  $ABCPE=39.6-52$ ;  $yf=27-36\%$ ). Quintana Roo tuvo la menor incidencia ( $yf=2.5\%$ ). TC fue mayor en brotes (enero-marzo) en Yucatán y Campeche (5922 y 8810), mientras que *A. spiraecola* fue en trampas amarillas (713 vs 49TC). TC no impactó en agregados espaciales (Morisita=0.89-0.99 y Lloyd=0.88-0.99), no ha inducido epidemias intensas ni la aparición de razas severas. Los dos índices desarrollados se validaron con el mapa de positivos históricos interpolados, mostrando mayor similitud con el Índice

Peninsular. En México, el CTV requiere un nuevo marco normativo con énfasis en prevención.

**Palabras clave:** *Citrus tristeza virus*, epidemiología, *Citrus sp.*

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISION DE LITERATURA</b>	
2.1 Importancia de la actividad citrícola .....	3
2.2. Virus Tristeza de los Cítricos.....	6
2.1.1. Hospedantes.....	7
2.1.2. Distribución geográfica .....	8
2.1.3. Detección e Identificación .....	9
2.1.4. Biología.....	13
2.2. Regionalización.....	15
2.2.1. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG).....	15
2.2.2. La estadística multivariada .....	20
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
3.1 Análisis y colección de datos históricos a nivel regional .....	29
3.2 Colecta y análisis serológico .....	30
3.3 Análisis Temporal del CTV.....	30
3.4 Análisis espacial del CTV.....	31
3.5 Colecta e identificación de áfidos.....	32
3.6 Selección de unidades para el estudio regional.....	32
3.7 Análisis de datos para el estudio regional.....	33
3.8 Caracterización molecular del CTV.....	33
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
4.1 Análisis regional de la dispersión histórica del CTV.....	34
4.2 Análisis temporal del progreso de la enfermedad .....	38
4.3 Análisis del arreglo espacial de árboles enfermos .....	39
4.4 Identificación de áfidos.....	43
4.5 Selección de unidades para el estudio regional .....	44
4.6 Formación de grupos de riesgos al CTV .....	47
4.7 Caracterización molecular del CTV.....	48
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>50</b>
<b>VI. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>51</b>
<b>VII. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1. Producción de cítricos en México.....</b>	<b>4</b>
<b>CUADRO 2. Hospedantes de CTV.....</b>	<b>7</b>
<b>CUADRO 3. Programas específicos y no específicos de uso común en los sistemas de información geográfica.....</b>	<b>17</b>
<b>CUADRO 4. Aplicación de sistemas de información geográfica en estudios regionales de algunas enfermedades en las plantas.....</b>	<b>19</b>
<b>CUADRO 5. Incidencia temporal de las siete huertas censadas en la Península de Yucatán considerando incidencias acumuladas. ....</b>	<b>31</b>
<b>CUADRO 6. Árboles de cítricos positivos a CTV en la Península de Yucatán del 1999 al 2008.....</b>	<b>34</b>
<b>CUADRO 7. Caracterización de huertos citrícolas comerciales y árboles positivos históricos a CTV en la Península de Yucatán en 34 unidades productoras seleccionadas por un muestreo ponderativo. ....</b>	<b>35</b>
<b>CUADRO 8. Parámetros asociados a curvas del progreso para seis epidemias de <i>Citrus tristeza virus</i> en cítricos, en la Península de Yucatán. ....</b>	<b>39</b>
<b>CUADRO 9. Tamaño óptimo del cuadrante, índices de Morisita y Llloid y tipo de patrón espacial del CTV, para seis huertas de la Península de Yucatán. ....</b>	<b>42</b>
<b>CUADRO 1.1. Anexo 1. Criterios y Factores de estratificación (Factor) para seleccionar el número de unidades regionales (parcelas) por municipio citrícola para integrar el tamaño total de muestra para las tres entidades federativas de la Península de Yucatán. ....</b>	<b>60</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de cítricos en el mundo.....	3
Figura 2. Producción nacional de cítricos .....	5
Figura 3. Valor de las exportaciones mexicanas de cítricos y sus derivados .	6
Figura 4. Distribución de CTV en el mundo (EPPO, 2006).....	8
Figura 5. Distribución nacional del Citrus tristeza virus.....	9
Figura 7. Síntomas más comunes asociados a CTV en México (a, b y c) y otras regiones con síntomas más severos (d, e, f y g) (Foto: G. Mora y otros).....	10
Figura 8. Proceso de detección molecular por ELISA e inmunopresión. (GIIIC-CP, 2008).....	12
Figura 9. Organización y mecanismos de expresión genómica del CTV, los rectángulos a diferente altura indican marcos abiertos de lectura (ORF), las flechas verticales indican puntos de corte de la poli-proteína, mientras que la flecha horizontal indica el punto de cambio de ORF. P-PRO= Proteinasa tipo papaína, MTR-1= Metiltransferasa. (Basado en: Doljia <i>et al.</i> , 1994; Karasev, 2000).....	14
FIGURA 10. Progreso temporal de la dispersión histórica del CTV de 1999 a 2008 en la Península de Yucatán bajo la operación de la norma NOM-031-FITO-200.....	37
FIGURA 11. Frecuencia de variables asociadas a la incidencia de la enfermedad. Edad de la planta (A), tipo de cítrico (B) en huertas de cítricos en la Península de Yucatán.....	37
FIGURA 12. Progreso temporal de la tristeza en siete huertas cítricas de la Península de Yucatán. La incidencia para todos los árboles de cada huerta se evaluó con Inmunopresión-ELISA.....	38
FIGURA 13. Mapas de interpolación geoestadística de árboles positivos a CTV correspondientes a huertos de cítricos de la Península de Yucatán..	40
FIGURA 14. Poblaciones de áfidos encontrados en huertas de cítricos de la Península de Yucatán de Junio 2010 a mayo 2011 (A y B). Especies de áfidos en trampas amarillas en huertas de cítricos en la Península. 2010-2011 (C y D). .....	44
FIGURA 15. Mapas interpolados de índices de riesgo epidemiológico en la Península de Yucatán. (A) Parcelario (34 huertas) y (B) Regional.....	45
FIGURA 16. Mapas interpolados de Península de Yucatán. (A) Temperatura mínima de enero y febrero; (B) Densidad cítrica; (C) Infestación de <i>T. citricida</i> .....	46
FIGURA 17. Mapa interpolado de positivos históricos (1999-2007) a CTV en la Península de Yucatán. ....	47

<b>FIGURA 18. Dendograma de similaridad para 34 huertas con presencia del virus del CTV considerando una distancia euclidiana de 0.98 y cuatro variables inductivas de la enfermedad. ....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURA 19. Patrones electroforéticos de árboles positivos a CTV mediante la técnica de SSCP. Una combinación de dos bandas dentro de cada corrida representa un haplotipo. Cada corrida representa un árbol positivo. Huerto Cabache 2, Municipio de Ticul, Yucatán. ....</b>	<b>49</b>
<b>FIGURA 1.1. Anexo Esquematización de la selección de unidades regionales de vigilancia por criterios de ponderación. ....</b>	<b>63</b>

## I. INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos, causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV), representó desde 1997 y hasta el 2007, un gran esfuerzo operativo y logístico nacional coordinado por la Dirección General de Sanidad Vegetal a través de la norma NOM-031-FITO-2000 consistente en monitoreo y muestreo de zonas cítricas para la detección y erradicación de árboles positivos al CTV. Actualmente, la estrategia contra el CTV requiere una redefinición con base en los antecedentes biológicos y epidemiológicos del CTV en México. En el mundo el CTV ha provocado la muerte de más de 100 millones de plantas desde 1930 (Rocha-Peña *et al.*, 1995, Cambra *et al.*, 2000). El virus es transmitido por injerto y áfidos, siendo *T. citricida* el vector más eficiente (Yokomi *et al.*, 1994, Loeza-Kuk *et al.*, 2008). El CTV produce dos efectos severos principales: declinamiento de árboles injertados sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y picado de tallo, lo que debilita las plantas y reduce el rendimiento (Cambra *et al.*, 2000). Sin embargo, en México predominan los aislamientos moderados que no son capaces de causar síntomas visibles y muerte de árboles en campo (Loeza-Kuk, 2008; Rivas-Valencia, 2008). El primer reporte del CTV en México se realizó en Tamaulipas en 1993 (Villareal, 2001) y posteriormente en viveros de Veracruz en 1996, mientras que TC se detectó en el Norte de la Península de Yucatán en el año 2000. Actualmente, el CTV está distribuido en todas las zonas productoras de cítricos del país, excepto Sinaloa y Chiapas, con un total de 16,248 plantas positivas a CTV (Dirección General de Sanidad Vegetal, 2008). Diversos estudios epidemiológicos han enfatizado la aplicación del muestreo y erradicación en la campaña contra el CTV, los cuales se han realizado para el Noreste del país en ausencia de TC. En el sureste, los trabajos han tratado de establecer el impacto de TC en el cambio estructural de la población de CTV (Góngora, 2004; Ruiz-García, 2008), pero no se han realizados estudios extensivos para valorar el estatus del CTV bajo la presencia de TC. En este trabajo se pretendió establecer el estatus actual de la dispersión del CTV bajo un contexto de vigilancia epidemiológica regional planteándose dos objetivos 1) evaluar la situación actual del CTV considerando el

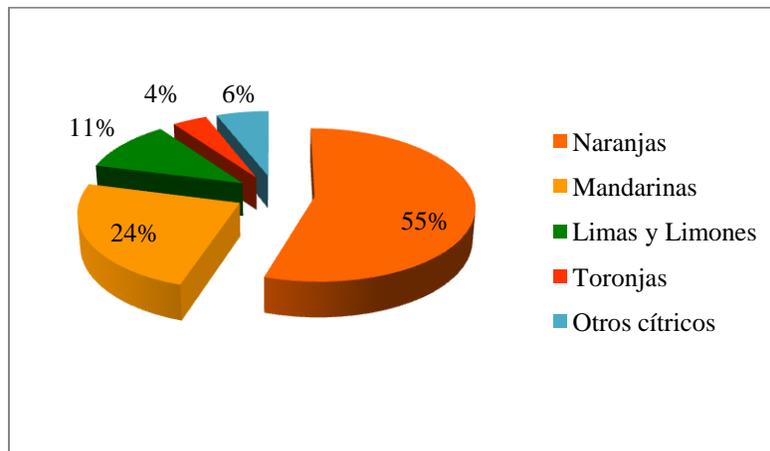
impacto de TC en la dispersión en la Península de Yucatán, y 2) regionalizar las zonas citrícolas de la Península de Yucatán respecto a detecciones históricas realizadas en relación a los subsistemas epidemiológicos, mediante el uso de Sistemas de Información Geográfica (SIG) y métodos multivariados, con el fin de estimar riesgos potenciales para la citricultura mexicana en una eventual redefinición del marco normativo asociado a esta enfermedad regulatoria en México.

## II. REVISION DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de la actividad citrícola

Los cítricos son las frutas de mayor importancia a nivel mundial con una producción de 177 millones de toneladas, representando alrededor del 22% de la producción total de frutas (FAOSTAT, 2009). La producción mundial de naranjas contribuyó con el 55% del total de cítricos, mandarinas con el 24%, limas y limones con el 11%, toronjas 4% y otros cítricos con el 6% (Fig. 1).

**Figura 1.** Producción de cítricos en el mundo



Fuente: FAOSTAT, Dirección de Estadística 2009

Entre los principales países productores de cítricos, México ocupa el cuarto lugar en la producción mundial después de China, Brasil y Estados Unidos (SIAP, SAGARPA, 2009), con una superficie alrededor de 539,957 hectáreas y una producción de 7,394,917 toneladas, predominando la producción de limón agrio (*Citrus aurantifolia*) y persa (*Citrus latifolia*). México es el principal exportador de limón persa en fresco de Estados Unidos.

Los cítricos representan un segmento económico fundamental de la agricultura mexicana. Las cuatro especies cítricas (naranja, limón, toronja y mandarina) son las que integran la cadena productiva identificada por la SAGARPA como Sistema Producto. Los principales estados productores son Veracruz, San Luis Potosí,

Michoacán, Tamaulipas, Colima y Nuevo León, donde se concentra el 75% de la superficie cultivada. Estos estados contribuyen con el 79% de la producción nacional (Cuadro 1), siendo Veracruz el mayor productor. El 63% de la superficie cultivada de cítricos se da en condiciones de temporal y 37% bajo riego.

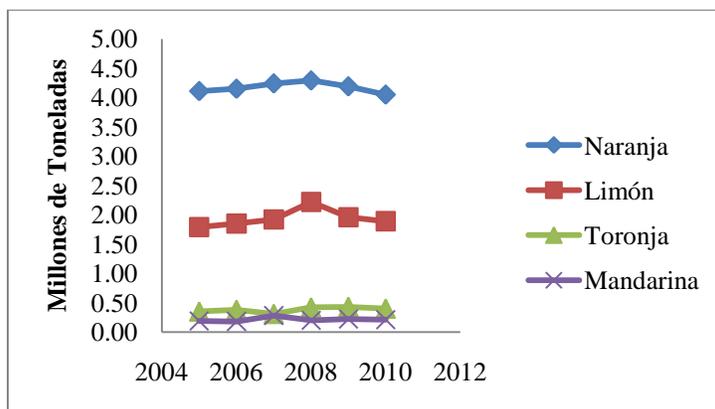
**Cuadro 1.** Producción de cítricos en México

<b>Estado</b>	<b>Sup. Sembrada (Ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>
Veracruz	213,475	2,781,635
San Luis Potosí	47,748	420,960
Michoacán	45,206	493,519
Tamaulipas	40,775	637,447
Nuevo León	30,764	288,673
Puebla	24,839	307,022
Oaxaca	22,613	271,656
Colima	21,903	386,452
Yucatán	19,633	262,346
Tabasco	15,481	162,658
Sonora	9,048	205,080
Hidalgo	5,763	48,811
Campeche	4,826	45,327
Quintana Roo	3,595	42,217
Chiapas	3,568	19,926
Otros	21,127	183,749
<b>Total Nacional</b>	<b>530,364</b>	<b>6,557,475</b>

Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, reportes con cifras al cierre 2010.

De las cuatro especies de cítricos destaca la naranja dulce (*Citrus sinensis*) tipo Valencia, la cual está ampliamente distribuida en 22 estados. La naranja ha contribuido con alrededor del 62% de la producción nacional de cítricos en los últimos años, reflejando una tendencia creciente, mientras que los limones con el 28%, las toronjas con el 6.1%, y las mandarinas con el 3.2% (Fig. 2) (SIAP, 2010).

**Figura 2.** Producción nacional de cítricos

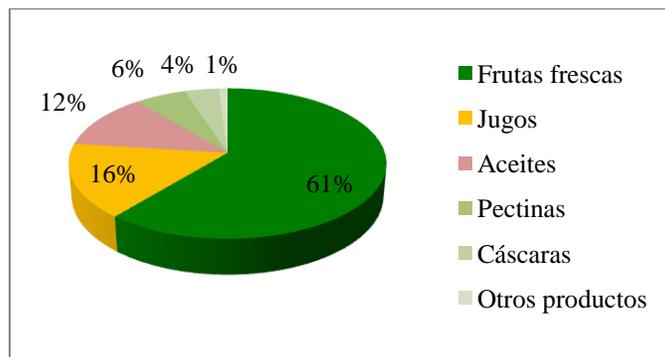


Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, reportes con cifras al cierre 2010.

El limón persa se produce en la Costa del Golfo de México, principalmente en los estados de Veracruz, Tabasco y, en menor medida, Oaxaca y Puebla. Esta es la variedad que México exporta en fresco en mayor volumen, aunque el limón mexicano también se exporta en menores cantidades. El limón mexicano cuenta con gran cantidad de aceite en la cáscara, por lo que es la materia prima con la que se procesa y exporta el aceite esencial.

La exportación de cítricos contribuyó con 286 millones de dólares a las divisas captadas en 2008 (Fig. 3), destacando por su importancia las exportaciones de fruta fresca (61%), jugos (16%), aceites esenciales (12%), pectinas (6%), cáscaras (4%) y en menor medida otros productos (1%). Este valor representó el 1.8% de las exportaciones agroalimentarias.

**Figura 3.** Valor de las exportaciones mexicanas de cítricos y sus derivados



Fuente: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), SAGARPA, reportes con cifras al cierre 2008.

## 2.2. Virus Tristeza de los Cítricos

La enfermedad llamada tristeza de los cítricos agente causal *Citrus tristeza virus* (CTV) aparece en todas las áreas del mundo donde estos se cultivan. En México, se encuentra presente en 20 de los 23 estados cítricos y es considerada una plaga cuarentenaria presente (SENASICA, 2010). Dicha enfermedad afecta prácticamente a todos los tipos de cítricos, pero principalmente a la naranja dulce, toronja y limón.

La enfermedad de la tristeza produce el colapso y decaimiento de los cítricos mediante desecación y marchitamiento más o menos repentino de hojas, seguidos por la muerte del árbol o muerte descendente de sus ramitas y recuperación parcial de estas últimas. La tristeza produce daños más severos en árboles de naranjo dulce que se injerta en patrones de naranjo agrio. Las pérdidas que originan la enfermedad varían ampliamente con la combinación vástago-patrón cultivada en una determinada área, con la variante del virus y con la abundancia y eficacia de los vectores. Este virus ha causado de manera directa e indirecta la muerte de más de 60 millones de árboles (Moreno *et al.*, 1993). Su posición taxonómica pertenece al reino y phylum virus, a la clase de cadena-simple, sentido

positivo de virus RNA, familia Closteroviridae y género Closterovirus, genoma que oscila entre 15 a 20 kb (Martelli *et al.*, 2002).

### 2.1.1. Hospedantes

El CTV infecta todas las especies, cultivares e híbridos de cítricos. También infecta algunos parientes de los cítricos como *Aeglopsis*, *Alfraegle*, *Fortunella* y *Pamburus*. Especies de *Passiflora* se han infectado experimentalmente (pero no naturalmente) y es único hospedante que no pertenece a la familia de las rutaceas (Cuadro 2).

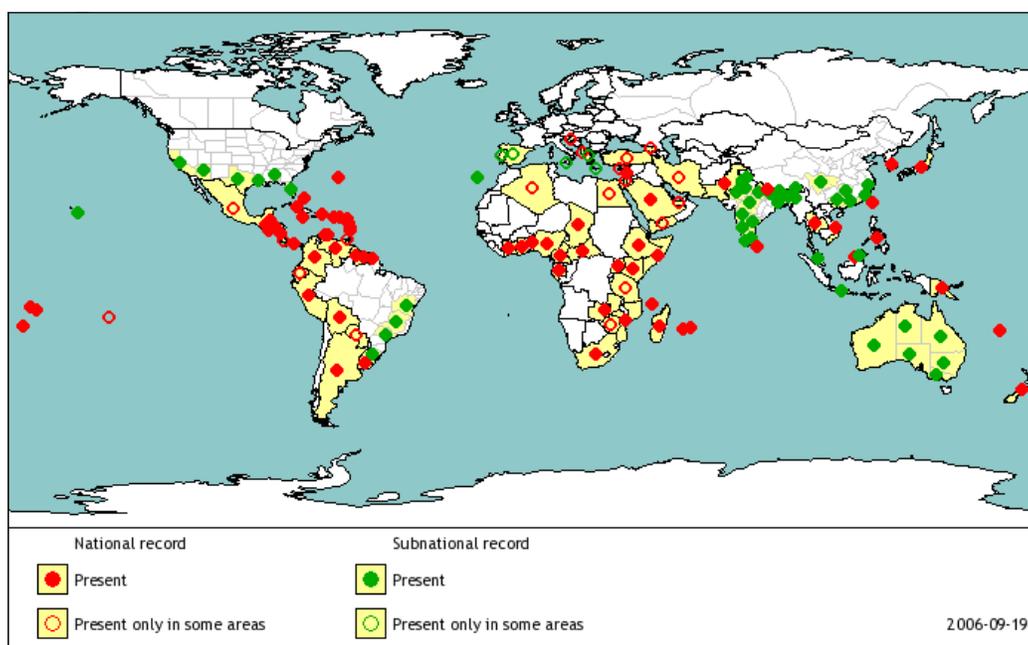
En la región mediterránea europea, los cítricos y parientes de los cítricos son los hospedantes de mayor preocupación en toda la zona mediterránea (EPPO).

**Cuadro 2.** Hospedantes de CTV.

	NOMBRE	NOMBRE COMÚN EN INGLÉS	NOMBRE COMÚN EN
Passifloraceae	<i>Passiflora</i>	Passionflower	Maracuyá
Rutaceae	<i>Citrus aurantifolia</i>	Key lime	Lima mexicana
	<i>Citrus aurantium</i>	Sour orange	Naranja agria
	<i>Citrus grandis</i>	Grapefruit	Pomelo
	<i>Citrus limon</i>	Lemon	Limón
	<i>Citrus paradise</i>	Grapefruit	Toronja
	<i>Citrus sinensis</i>	Sweet orange	Naranja dulce
	<i>Citrus</i> sp.		Cítricos en general
	<i>Aeglopsis</i>		Limonaria
	<i>Alfraegle</i>		
	<i>Fortunella</i>		
	<i>Pambuerus</i>		

### 2.1.2. Distribución geográfica

El CTV está presente en todas las zonas tropicales productoras de cítricos. Históricamente, el primer reporte de daños relacionado con la enfermedad fue en 1910 en Sudáfrica, donde reportaron la muerte de árboles de cítricos injertados sobre naranjo agrio (Weber, 1943). Posteriormente en 1931 se reporta la entrada al continente americano en Argentina y, en 1937 en Brasil, donde se encontró una enfermedad que ocasionaba el declinamiento de los cítricos y que etiológicamente se trataba de un virus (Fawcett y Wallace, 1946) (Fig. 4).



**Figura 4.** Distribución de CTV en el mundo (EPPO, 2006).

En México, a excepción de Sinaloa, Chiapas y Queretaro, actualmente la distribución del CTV incluye todas las regiones productoras de cítricos (SENASICA, 2011) (Fig. 5).



**Figura 5.** Distribución nacional del Citrus tristeza virus.

### 2.1.3. Detección e Identificación

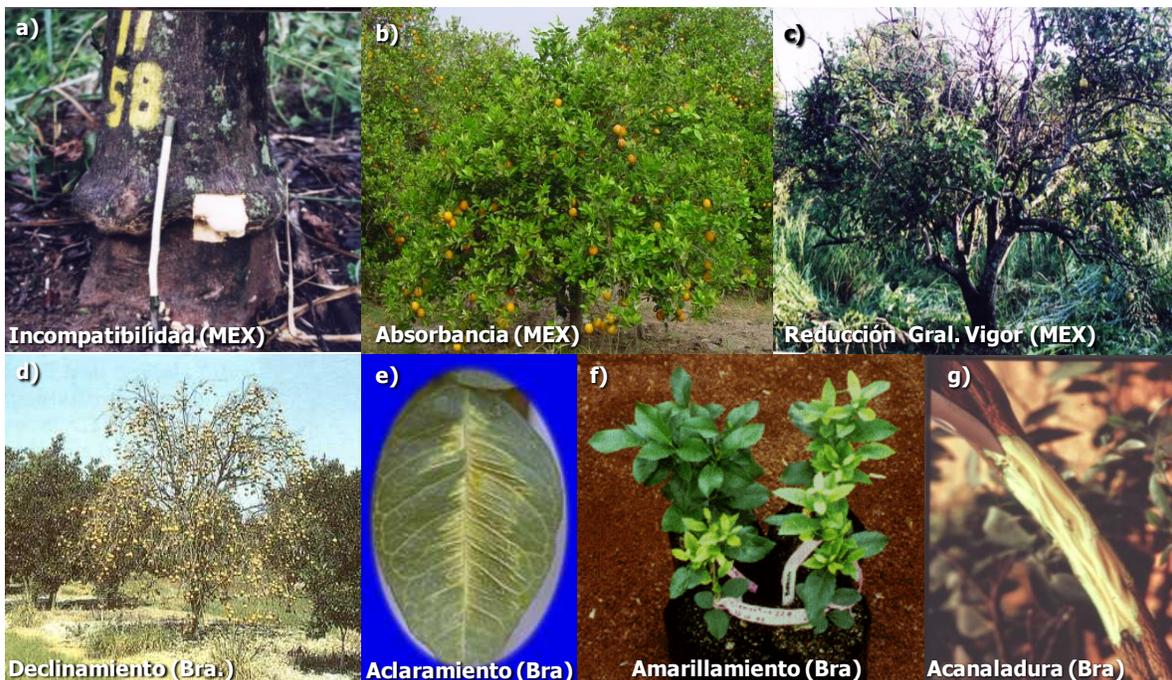
#### **Síntomas**

Arboles injertados sobre naranjo agrio usualmente muestra muerte regresiva y defoliación, y en muchos casos declinamiento completo (Fig. 7d). Esta sintomatología es causada por la muerte de las raíces como consecuencia de la necrosis inducida por el virus por debajo de la unión del brote (Fig. 7a). Las células de los radios medulares de la corteza se lignifican en esta área y produce el síntoma llamado picadura inversa o formación de poros. Sin embargo, este síntoma no es específico de la tristeza y también puede ser inducido por *Spiroplasma citri* (EPPO/CABI, 1996b).

El CTV también puede inducir picado de tallo, retraso en el crecimiento, aclaración de nervaduras (Fig. 7e), bajo rendimiento y mala calidad de la fruta en algunas

variedades de cítricos independientemente del patrón usado (Olson, 1956 y 1958; Rocha-Peña *et al.*, 1995). El amarillamiento de plántulas (seedling pitting) (Fig. 7f), fue descrito por primera vez en Australia por Fraser (Wallace y Drake, 1961) un síndrome usualmente no observado en el campo, que consiste en el retraso del crecimiento y amarillamiento de las hojas de naranja agria, plántulas de limón (*C. limón* L.) o pomelo (*C. paradisi*) (Bar-Joseph y Lee, 1989).

Los cultivos afectados y la intensidad de los síntomas dependen de la cepa del virus. Algunas cepas agresivas pueden inducir picado de tallo en más cultivos de cítricos.



**Figura 7.** Síntomas más comunes asociados a CTV en México (a, b y c) y otras regiones con síntomas más severos (d, e, f y g) (Foto: G. Mora y otros)

### **Morfología**

El CTV es un closterovirus con partículas de 2000 nm de largo y 12 nm de ancho. La proteína de la cápside tiene un peso molecular de 27 000-28 000. La partícula contiene un RNA monocatenario con un tamaño aproximadamente de  $6.5 \times 10^6$  (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

### ***Métodos de detección e identificación***

Existen diferentes métodos de identificación del CTV. Entre estos están los serológicos, el cual se basa en la capacidad de reconocimiento y combinación que tienen los anticuerpos a un antígeno específico (Abbas *et al.*, 1991; Matthews, 1991) 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). Recientemente, solo se han podido obtener líneas puras (clones) de anticuerpos que solo reaccionan con un solo determinante antigénico de una proteína. A finales de la década de los setentas, se desarrollo la técnica serología denominada ELISA (de Enzyme-Linked Inmuno Sorbent Assay) la cual consiste en la adquisición del anticuerpo a una superficie de poliestireno (fase solida), esta unión no es específica y no incluye una reacción serológica. A este anticuerpo absorbido se le agrega el antígeno el cual atrapa y detecta por otro anticuerpo conjugado y marcado con una enzima. El diagnostico se hace con la adición del sustrato específico a la enzima y un cambio de color relévela la presencia del virus (Fig. 8) (Agrios, 2001).



**Figura 8.** Proceso de detección molecular por ELISA e inmunoprecipitación. (GIIC-CP, 2008)

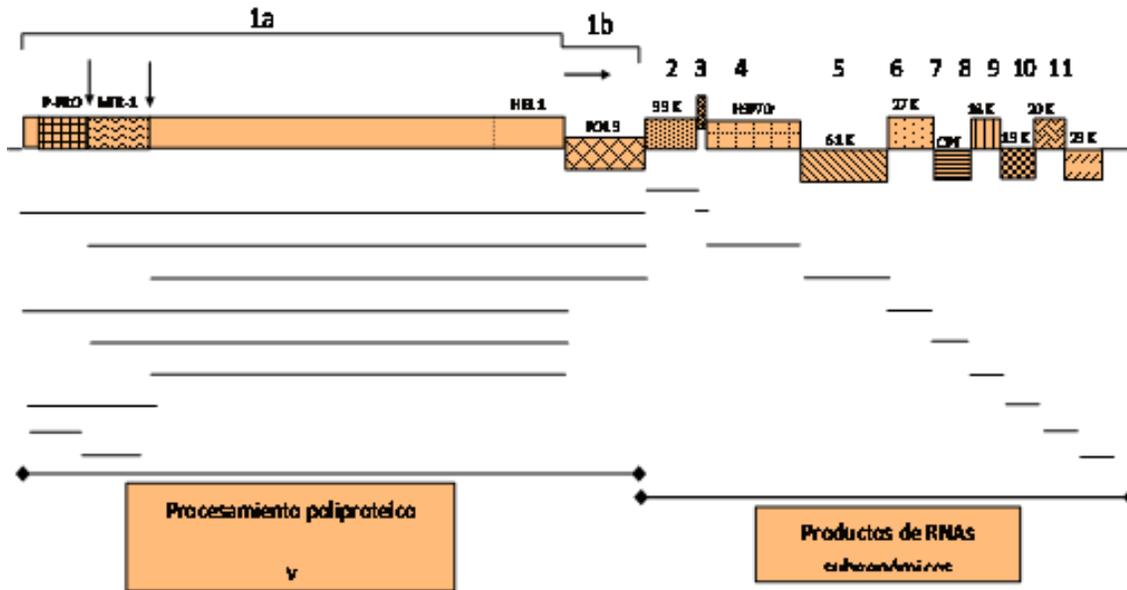
Las aplicaciones de la biotecnología en la fitopatología a través de las técnicas moleculares como la retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de punto final y tiempo real son otras opciones, mediante la cual con un conjunto de iniciadores es posible diferenciar de manera rápida aislamientos del virus (Ayllon *et al.*, 2000). La hibridación con sondas, puede caracterizar aislamientos presentes en árboles o áfidos rápidamente, sin necesidad de realizar extracción del RNA viral (Narvaez, 2000), sin embargo su precisión y exactitud se ve comprendida a baja concentraciones del virus. Sin embargo, estas técnicas se han empleado exitosamente para estudios de diversidad poblacional del CTV (Ayllón *et al.*, 2001; Sambade *et al.*, 2002) 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 explicar y prevenir cambios de intensidad epidémica.

## 2.1.4. Biología

### ***Composición y Estructura***

El CTV está constituido por una cadena de ácido ribonucleico (RNA) sencilla que se compone de filamentos con 12 marcos de lectura abierta (ORF) que pueden codificar al menos 17 proteínas (Satyanarayana *et al.*, 2002) y viriones que contienen un gran número (aprox. 20 kb) de una sola hebra positiva genómica RNA (gRNA) (Bar-Joseph y Lee, 1990) encapsulada por dos proteínas de la cubierta CP1 y CP2 en una proporción de 5:1, la de mayor porcentaje en el virion (CP1) tiene un peso molecular de 25 kDa cubriendo 95%, mientras que CP2 es de menor proporción con un peso de 27 kDa cubriendo 5% de la longitud de la partícula (Lee *et al.*, 1988; Febres *et al.*, 1996; Karasev, 2000). Además de los ORF hay dos regiones no traducibles de 107 pb y 27 pb en las regiones terminales 5' y 3', con alta variabilidad en uno de los extremos 5' con 44% y bastante conservada en el extremo 3' con más de 97% de similitud entre aislamientos de diferentes procedencias (Karasev *et al.*, 1995; Ayllón *et al.*, 1999; Karasev, 2000; Ayllón *et al.*, 2001). Los ORF 1<sup>a</sup> y 1b son traducibles directamente del RNA genómico por un mecanismo de cambio de marco de lectura y procesamiento de la poliproteína viral, generando una polimerasa dependiente de RNA, dos proteasas tipo papaína, una metiltransferasa y una helicasa (Figura 9). La estrategia de replicación del virus, es frecuente en aislamientos purificados mediante la transmisión secuenciada en diferentes hospedantes y/o purificación por áfidos, persistan RNA subgenómico (sgRNA) (Bar-Joseph *et al.*, 1979; Dolja *et al.*, 1994; Candresse y Martelli, 1995) que pueden modificar la expresión de síntomas o inferir con la clonación en vectores de clonación (Ballester-Olmos *et al.*, 1993). Debido al comportamiento replicativo y la perennibilidad de los hospedantes, la infección natural del CTV se presenta como mezclas de variantes, las cuales se presentan en árboles de reinfestación constante de áfidos (Grant and Higgins, 1956; Powell *et al.*, 1992; Moreno *et al.*, 1993). 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 de baja frecuencia que inducen síntomas severos (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Broadbent *et al.*, 1996).



**Figura 9.** Organización y mecanismos de expresión genómica del CTV, los rectángulos a diferente altura indican marcos abiertos de lectura (ORF), las flechas verticales indican puntos de corte de la poli-proteína, mientras que la flecha horizontal indica el punto de cambio de ORF. P-PRO= Proteinasa tipo papaína, MTR-1= Metiltransferasa. (Basado en: Doljia *et al.*, 1994; Karasev, 2000).

### Comportamiento

El virus de la tristeza se encuentra ampliamente distribuido entre los árboles de las áreas citrícolas. En algunas localidades, el 100% de los árboles llevan el virus. La propagación de este se lleva a cabo con rapidez mediante el uso de órganos de propagación infectados por el virus, tales como vástagos y patrones y a través de insectos vectores. Aparentemente, la infección de los cítricos por el virus de la tristeza se produce solo cuando este se introduce en los tubos cribosos del floema. Parece ser que el virus se limita a unas cuantas células de floema en cada haz vascular y esto puede explicar la capacidad que tiene una segunda variante

del virus para infectar a la misma planta propagándose en algunas de las células restantes del floema (Agrios, 2001). Esta condición es extremadamente útil para purificar aislamientos mezclados procedentes de campo (Moreno *et al.*, 1993; d'Urso *et al.*, 2000). El comportamiento del virus en las diferentes especies cítricas es diferente. Cambra *et al.*, 1988 injertó el aislamiento no severo T-300 en diferentes especies de cítricos, y encontró un movimiento casi nulo en *Poncitrus trifoliata*, mientras que en limón mexicano y naranja dulce la translocación ocurrió a los tres meses después de la inoculación. En naranjo agrio (*Citrus aurantium*) el movimiento del virus es tan lento que puede causar su declinamiento sin que se pueda detectar en la parte aérea (Ben-ze'ev *et al.*, 1989).

### ***Mecanismos de movimiento o distribución en el hospedante***

El movimiento del virus en plantas jóvenes (menores de un año) de naranjo agrio, ocurre a los 44 días después de la inoculación por injerto a la parte basal (raíz) y posteriormente a los 58 días a la parte aérea, mientras que en plantas mayores de un año este mismo movimiento requiere más de 6 meses y en árboles de pomelos la movilización es en dos o tres años (Gafni *et al.*, 1995).

## **2.2. Regionalización**

### **2.2.1. Los Sistemas de Información Geográfica (SIG)**

En general, un Sistema de Información consiste en la unión de información y herramientas informáticas (programas) para su análisis con unos objetivos concretos. En el caso de los SIG, se asume que la información incluye la posición en el espacio (Alonso, 2000).

## ***Antecedentes***

La difusión de los Sistemas de Información Geográfica (SIG) ha sido muy rápida, primero en Estados Unidos y después en Europa, desde la década de 1960-1969 (Marble, 1984). En los primeros momentos se necesitaba equipo potente para poder trabajar con ellos; pero poco a poco con el desarrollo de las computadoras han simplificado el uso de este tipo de programas. Algunos autores han llegado a afirmar que los Sistemas de Información Geográfica son el paso adelante más importante desde la invención del mapa (Chorley, 1987).

## ***El concepto SIG***

No se sabe si realmente este nuevo avance es tan crucial pero, sin duda, se trata de una útil herramienta que facilita la compilación, análisis y divulgación de los datos geográficos. Además, los sistemas de Información geográfica ofrecen numerosas ventajas respecto a la cartografía convencional, puesto que de forma automática permiten manejar datos espaciales internamente referenciados, producir mapas temáticos y realizar procesos de información de tipo digital (Conesa-García, 1996 citado por Bosque, 1997).

Un aspecto muy reciente del uso de los *sistemas de información geográfica* es su generalización y difusión masiva en la actual sociedad de la información. Cada vez más a menudo, los diferentes sectores económicos se ven obligados a hacer uso de estos instrumentos en su actividad cotidiana. Estas se extienden a usos de actividad científica, o a usos en la gestión empresarial, desde la integración entre los sistemas de información geográfica y modelos de simulación ambiental, hasta la denominada agricultura de precisión.

La información geográfica con la cual se trabaja en los SIG, puede encontrarse en dos tipos de estructuras de datos o formatos conocidas como vector y raster. El formato vectorial está compuesto por tres diferentes atributos: líneas, puntos y polígonos; mientras que el formato raster está compuesto por atributos de barrido o píxeles (Nelson *et al.*, 1999).

## Componentes del SIG

El SIG es un sistema hardware, software, datos y usuarios que permiten capturar, almacenar, desplegar, cartografiar y analizar información geográfica, y con ello, ayudar a la toma de decisiones. El hardware se considera como la estructura donde reside un SIG, puesto que es donde se almacena la información. El software analiza la información para elegir, seleccionar, identificar, encontrar y relacionar elementos y rasgos geográficos. Los datos pueden ser gráficos o tabulares y la captura se logra mediante procesos de digitalización, procesamiento de imágenes de satélites, fotografías, GPS, entre otros. La tecnología de los SIG debe contar con personal especializado para operar, desarrollar y administrar el sistema, el cual establezca los planes para aplicarlos en problemas del mundo real (Soria *et al.*, 1998). Algunos programas específicos y no específicos que son de uso común en los SIG se muestra en el Cuadro 3 (Góngora-Canul, 2004).

**Cuadro 3.** Programas específicos y no específicos de uso común en los sistemas de información geográfica.

Programa	Específico o para SIG	Características principales	Origen
<b>IDRISI®</b>	Si	Posee 150 módulos para la captura, despliegue y análisis de datos geográficos, análisis espacial y estadístico, operadores matemáticos, soporte de decisiones, manejo de base de datos, análisis de series de tiempo, trabaja con formato raster y vectores.	George Perkins Marsh Institute-Clark University, EUA.
<b>Arc View®</b>	Si	Análisis espacial, toma de decisiones, realiza mapas con fines comerciales, manejo de base de datos, puede operar con interfaces, trabaja con formato raster y vectores.	Environmental System Research Institute, Inc. EUA.
<b>Arc View GIS 3.2®</b>	Si	Análisis espacial, formato de intercambio de mapas, digitalización de mapas, modulo de programación, trabaja con formato raster y vectorial.	Environmental System Research Institute, Inc. EUA.
<b>ILWIS®</b>	Si	Integrador de imágenes vectoriales y datos temáticos, digitalizador de mapas, análisis espacial de datos, importa y exporta múltiples formatos de datos.	Integrated Land and Water Information System (ILWIS). Desarrollado por el ITC holandés (International Institute for Aerospace Survey and Earth

<b>Arc Info®</b>	Si	Modelos de geoprocésamiento, análisis e integración de datos, análisis estadístico, procesos de automatización, 35 formatos de datos, trabaja con formato raster y vectores.	13 Sciences) Environmental System Research Institute, Inc. EUA.
<b>Map Info®</b>	Si	Integrador de softwares, datos y servicios para la toma de decisiones, análisis de datos, interfaces con otros softwares, trabaja con formato raster y vectorial accesibilidad a mapas y datos vía Internet.	
<b>ERDAS®</b>	Si	Procesamiento de imágenes, organiza imágenes en un catálogo, análisis espacial, intercambio de bases de datos, trabaja con datos raster y vectoriales.	ERDAS Inc. (Earth Resources Data Analysis System), Atlanta, GA, EUA.
<b>ArcGis 9.0</b>	Si	Gestión de datos, planificación y análisis de riesgos	Environmental System Research Institute, Inc. EUA.
<b>GS+®</b>	No	Análisis espacial (geostatística).	Geostatistics for the environmental science. Gamma
<b>SAS®</b>	No	Despliegue y manipulación de mapas.	Design Software MI, USA Cary NC, EUA.

\*Tomado de Gongora-Canul, 2004. Actualizado por S. Dominguez 2011.

### ***Aplicaciones en la agricultura***

El SIG ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad en diferentes estudios enfocados a la agricultura, permitiendo procesar gran cantidad de información y apoyar a la toma de decisiones (Álamo *et al.*, 2003). A nivel mundial una serie de ejemplos son citados para ilustrar algunas de las formas en el cual el SIG puede ser aplicado en la agricultura, tal es el caso de estudios de enfermedades donde se muestran las aplicaciones de los SIG para describir a nivel regional patrones espaciales y temporales en poblaciones de plantas, donde en conjunto con los aspectos geográficos ayudan a un mejor manejo de las enfermedades (Nelson *et al.*, 1994; Orum *et al.*, 1997; Jaime-García *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006).

Actualmente la tecnología del SIG en enfermedades cuarentenadas puede ayudar a pronosticar la introducción en algún país y la dispersión dentro de las regiones una vez que están establecidas. Esto se puede debido a los principios de los SIG, los cuales trabajan con bases de datos organizadas y que pueden ser

administradas desde un servidor y actualizadas rápidamente. El modelaje en la agricultura ayuda a pronosticar la introducción de plagas o enfermedades y pueden representarse en términos de espacio y tiempo. Además, en combinación con otros datos dentro de las mismas matrices de datos, tales como hospedante, factores fenológicos, factores climáticos delimitan áreas de riesgos (Dobesberger y MacDonald, 1992). En la fitopatología el SIG se puede combinar con otras herramientas como el análisis multivariado, p.e. análisis de componentes principales, de factores y conglomerados, que hacen una clasificación de regiones con similitud de características en función a las variables climáticas o biológicas para la generación de dendogramas (Góngora-Canul, 2004).

En México, un ejemplo del uso SIG en el cultivo de cítricos es llevado por el Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos (GIIC), a través de un estudio realizado en estados de Nuevo León y en la Península de Yucatán sobre una enfermedad de reciente introducción al País el Huanlongbing (HLB), causado por la bacteria *Candidatus Liberibacter spp* y transmitida por el psílido asiático de los cítricos *Diaphorina citri*. Se presenta la delimitación espacial de zonas de riesgos para el desarrollo del vector, mediante la integración de variables agroclimáticas del sistema epidemiológico que incluye el número de generaciones potenciales de *D. citri* por año y por estación meteorológica empleando la superficie sembrada y el número de días con condiciones favorables al vector, posteriormente mediante interpolación espacial se delimitan zonas de riesgos. Esta información ayuda a la planeación de estrategias de control para la reducción de poblaciones del vector, su control de esa enfermedad (Díaz-Padilla, 2011). Ejemplos del uso del SIG en otros patosistemas se indican en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Aplicación de sistemas de información geográfica en estudios regionales de algunas enfermedades en las plantas.

<b>Patógeno</b>	<b>Lugar</b>	<b>Cita</b>
<b>Virus-cucurbitáceas</b>	<b>jitomate,</b> Sinaloa, México	Nelson <i>et al.</i> , 1994.
<b>Aspergillus algodón</b>	<b>flavus-</b> Arizona, EUA	Orum <i>et al</i> , 1999
<b>Aspergillus</b>	<b>flavus-</b> Arizona, EUA	Orum <i>et al.</i> , 1997

<b>algodón</b>		
<b><i>Xantomonas axonopodis</i></b>	Florida, EUA	Gottwald <i>et al.</i> , 2002.
<b>p.v. citri-cítricos</b>		
<b><i>Bremia lactucae</i></b> -lechuga	California, EUA	Wu <i>et al.</i> , 2001.
<b><i>Phytophthora infestans</i></b> -papa	Mundial	Hijmans <i>et al.</i> , 2000.
<b><i>Phytophthora infestans</i></b> -papa y jitomate	Sinaloa, México	Jaime -Garcia <i>et al.</i> , 2001
<b>CTV-cítricos</b>	California, EUA	Polek, 1995.
<b>CTV-cítricos</b>	Tamaulipas, México	Góngora-Canul <i>et al.</i> , 2004.
<b>CTV-cítricos</b>	Península Yucatán, México	Domínguez-Monge <i>et al.</i> , 2010.
<b>HLB-cítricos</b>	Nuevo León, México	Díaz, <i>et al.</i> , 2010

Tomado de Góngora-Canul. Actualizado por S. Domínguez, 2011

### 2.2.2. La estadística multivariada

Los fenómenos de estudios son frecuentemente multifacéticos y complejos. En el campo científico estos fenómenos complejos involucran un número de variables interrelacionadas que tienen la intención de capturar los aspectos específicos de los fenómenos bajo estudio. En concreto, la estadística multivariada representa una multitud de métodos estadísticos que ayudan a analizar numerosas medidas interrelacionadas con la finalidad de clasificación, discriminación o correlación sin perder variabilidad principal (Raykov, *et al.*, 2008). La estadística es una herramienta potente que se aplica en la epidemiología cuando se quiere analizar más de una variable dependiente, junto con una o más variables independientes que están en general, todas relacionadas entre sí. Debido a la dificultad de abordar las cuestiones complejas de investigación con análisis univariado y debido a la disponibilidad de programas de cómputo como el SAS para la realización de análisis multivariado, las estadísticas multivariadas han sido ampliamente utilizadas. A continuación se describen algunas técnicas multivariadas que son utilizados en fitopatología.

## **Análisis de Componentes Principales**

El análisis de componentes principales (ACP) es una técnica multivariada exploratoria para la formación de nuevas variables llamadas componentes principales (CP) las cuales son combinaciones lineales de las variables originales. El número máximo de nuevas variables que pueden ser formadas es igual al número de variables originales y las nuevas variables son autocorrelacionadas entre sí (Sharma, 1996). Este método se basa fundamentalmente sobre las nociones de los valores y vectores propios. Esta técnica no sólo reduce la complejidad y dimensionalidad de los datos observados a una forma más simple, sino que también estos datos pueden ser utilizados en aplicaciones de otros métodos multivariados (p.e. análisis de varianza o análisis de regresión) (Mardia *et al.*, 1979). El objetivo principal del ACP, es construir un indicador de ciertas características con base en las “p” variables originales de interés para reducir la complejidad de las interrelaciones entre el número elevado de variables observadas a un número relativamente más pequeño de combinaciones lineales consideradas como componentes principales (Raycov *et al.*, 2008). En gran medida, la interpretación de los componentes principales es en general guiada por el grado en que cada variable está asociada con un componente en particular. Estas variables que se encuentran más relacionadas a un componente en cuestión, son utilizadas como una guía para la interpretación.

Los componentes principales tienen una variedad de propiedades útiles: la primera componente principal tiene la varianza máxima entre todas las CP, la segunda CP la segunda varianza máxima, etc. Además, las componentes principales obtenidas son independientes entre sí. Para la construcción de un conjunto de datos con  $p$  variables numéricas  $Y_i$  ( $i=1,2,\dots,p$ ), las  $q$  componentes  $Z_j$  ( $j=1,2,\dots,q$ ) pueden ser obtenidas con ayuda de programas computacionales. Cada componente principal es una combinación lineal de las variables originales, con coeficientes iguales a los vectores propios de la matriz de correlación o covarianza y se expresa de la siguiente forma:

$$Z_i = a_1 X_1 + a_2 X_2 + \dots + a_p X_p$$

Los vectores propios de los componentes principales son ortogonales para maximizar la discriminación entre variables. Cuando se busca una componente de Z, el vector de constantes y el vector que tiene las p variables originales de interés, son determinados por los vectores propios de la matriz de covarianza o correlación donde se desea que la varianza de cada componente principal de Z tenga el valor máximo obtenido a través de los valores propios de esas matrices. El valor propio de la matriz de correlación y/o covarianza de los componentes formados, así como, el valor acumulativo de las componentes seleccionadas (p.e. 0.85) el cual representa el porcentaje de confiabilidad de dicha selección podrían contribuir a la selección del número de variables de los vectores propios formados del fenómeno en estudio.

Como se mencionó anteriormente, se deben seleccionar las componentes principales que expliquen la mayor varianza del valor acumulativo, la cual está en función del criterio del investigador, sin embargo, un valor aceptable podría ser del 85% (0.85 valor acumulativo) como se encuentra en la literatura. Por otra parte Mora-Aguilera y Campbell (1997) sugieren que cuando se tiene un número grande de variables originales de la matriz de datos, un valor propio acumulado aceptable podría ser de 0.70.

Una vez seleccionado el número de componentes principales, el número del valor propio de la primera componente determina el número de variables a seleccionar en la matriz de vectores propios. En ese número de CP's seleccionados y con el número de la primera CP del valor propio se consideran las variables con mayor valor influyendo que son las variables que tienen mayor importancia en el fenómeno de estudio (Mora-Aguilera y Campbell, 1997).

### ***Aplicación en fitopatología***

Madden y Pennypacker (1979) estudiaron la estructura de 18 epidemias de tizón temprano (*Alternaria solani*) del tomate. Las variables de mayor importancia en la descripción de las epidemias analizadas con Componentes principales fue el nivel de la enfermedad, la tasa de crecimiento y la forma de la curva. En otro estudio,

donde caracterizaron 60 epidemias de papaya ringspot en plantaciones de papaya utilizando un análisis de rotación (varimax rotation), fueron formados 10 componentes principales para la exploración de los valores atípicos donde demostraron que a partir del segundo y tercer CP se ve un claro valor atípico. Estos resultados indicaron que un valor atípico no necesariamente aparece en los primeros dos ejes como se reporta en la literatura (Mora-Aguilera, *et al.*, 1993). En el patosistema CTV-cítricos en un estudio de regionalización de la enfermedad en 20 huertas con presencia del virus del CTV fueron seleccionados 4 componentes que explicaron el 76% del fenómeno en estudio con base a sus valores propios (0.85) para la selección de las variables más inductivas de la enfermedad a nivel regional (Góngora-Canul, *et al.*, 2004).

### **Análisis de Factores**

El análisis de factores (AF) representa una técnica estadística es similar al análisis de componentes principales puesto que disminuye el número de variables correlacionadas a un menor número de variables no correlacionadas, sin embargo es distinto de ACP en varios puntos.

Una fuente frecuente de confusión en el estudio de análisis de factores es el término factor el cual se refiere a la variable hipotética no observable como en la frase factor común. En este sentido, las variables observables son combinaciones lineales de la variable hipotética no observable llamada factor. El factor es también usado en el sentido de factor de matriz, en el que una matriz es un factor de una segunda matriz si la primera matriz multiplicada por esta es igual a transponer la segunda matriz. En este sentido, el análisis de factores se refiere a todos los métodos de análisis de datos usando factores de matrices, incluyendo análisis de componentes y análisis de factores comunes.

Un factor común es una variable hipotética, no observable que contribuye a la varianza de por lo menos dos de las variables observadas. El término incondicional “factor” frecuentemente se refiere a un factor común. Un factor único es una variable hipotética, no observable que contribuye a la varianza de al menos

una de las variables observadas. El modelo para el análisis de factores postula un factor único por cada variable observada. La ecuación para el modelo de factor común es:

$$Y_{ij} = x_{i1}b_{1j} + x_{i2}b_{2j} + \dots + x_{iq}b_{qj} + e_{ij}$$

Donde

$Y_{ij}$  Es el valor de la *i*-ésima observación en la *j*-ésima variable

$b_{kj}$  Es el coeficiente de regresión del *k*-ésimo factor común para predecir la *j*-ésima variable

$e_{ij}$  Es el valor de la *i*-ésima observación en el *j*-ésimo factor único

$q$  Es el número de factores comunes

Una vez que los factores han sido estimados, es necesario interpretarlos. Usualmente se le asigna a cada factor común un nombre que refleje la importancia del factor en cada predicción de las variables observadas, que son los coeficientes en la matriz correspondiendo al factor. La interpretación del factor es un proceso subjetivo. Esto puede ser menos subjetivo por rotación de los factores comunes, que es, por la aplicación de la transformación lineal.

Después de la extracción del factor inicial, los factores comunes son autocorrelacionados con unos y otros. Si los factores son rotados por una transformación ortogonal, los factores rotados son también autocorrelacionados. La rotación de los factores simplifica su estructura.

### ***Aplicación en fitopatología***

Mora-Aguilera y colaboradores (1993) midieron nueve variables de las curvas de progreso utilizando un análisis de rotación (varimax rotation) para caracterizar 60 epidemias del virus de la mancha anular del papayo. Obtuvieron 10 CP's o factores. El factor 1 representó el modelo de Gompertz ( $K_G$ ), el Factor 2 la incidencia inicial ( $Y_0$ ), el Factor 3 tiempo después del trasplante ( $X_0$ ), Factor 4 la incidencia final ( $Y_f$ ), factor 5 duración total de la epidemia ( $T_t$ ), Factor 6 tiempo del 50% de la incidencia final ( $T_{50}$ ), Factor 7 forma de la curva ( $c$ ), Factor 8 la escala

de la curva (b), Factor 9 el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (AUDPC), Factor 10 la AUDPC estandarizada por el tiempo (AUDPCs) donde fue comparado con el Análisis de Componentes principales para detectar valores atípicos y variables redundantes, así como para reducir el número de variables originales.

### **Análisis discriminante**

El análisis Discriminante (AD) es una técnica estadística multivariada cuya finalidad es analizar si existen diferencias significativas entre grupos de objetos respecto a un conjunto de  $p$  variables (variables discriminantes). Más concretamente, se comparan y describen las medias de las  $p$  variables clasificadoras a través de los grupos.

En caso de que estas diferencias existan, intentará explicar en qué sentido se dan y proporcionar procedimientos de asignación sistemática de nuevas observaciones con grupo desconocido a uno de los grupos analizados, utilizando para ellos sus valores en las  $p$  variables clasificadoras (éstos sí, conocidos).

Podemos ver este procedimiento como un modelo de predicción de una variable respuesta categórica (variable grupo) a partir de  $p$  variables explicativas generalmente continuas (variables clasificatorias).

El análisis discriminante es un método que puede ser usado en un entorno de grupo múltiple para saber cómo un conjunto de variables dependientes (o variables explicativas) está relacionada con la pertenencia al grupo, y en particular la forma en que puede combinarse con el fin de mejorar la comprensión de las diferencias entre grupos. En términos más formales, AD tiene como objetivo desarrollar una regla para describir y posteriormente predecir si es necesario pertenecer al grupo, basados en conjunto de variables.

## **Aplicación en fitopatología**

En un estudio de frutos de guayaba donde se aisló a *Colletotrichum spp*, fueron comparadas características morfológicas de los conidios, crecimiento a diferentes temperaturas, presencia o ausencia de setas, formación de la fase sexual y su relación con el síntoma. El análisis multivariado indicó diferencias entre los aislamientos de *C. gloeosporioides* de las ocho variables evaluadas para tres funciones discriminantes (FD). El análisis discriminante a través de las funciones discriminantes (FD1 y FD2) separó a los aislamientos en cuatro grupos diferentes con base en la longitud de los conidios y diámetro de la colonia a 20 °C (Alonso *et al.*, 2002).

## **Análisis de conglomerados**

El análisis de conglomerados (cluster en inglés), es una técnica multivariada que busca agrupar elementos (o variables) tratando de lograr la máxima homogeneidad en cada grupo y la mayor diferencia entre los grupos.

El dendograma es la representación gráfica que mejor ayuda a interpretar el resultado de un análisis cluster.

El análisis de conglomerados se puede combinar con el análisis de componentes principales, ya que mediante ACP se puede homogeneizar los datos, lo cual permite realizar posteriormente un análisis cluster sobre los componentes obtenidos.

El objetivo del AC se basa en  $p$  variables originales (en CP's, o variables canónicas) donde se desea realizar una agrupación de los casos u observaciones del fenómeno en estudio. Obsérvese, que para el análisis discriminante los grupos son conocidos, mientras que para el AC los grupos se van a formar para indicar a cual grupo pertenece un cierto objeto (Hau y Kranz, 1990; Romesburg, 1990).

## ***Criterios de agrupación***

Hay un gran número de criterios de agrupación que dependen de una diversidad de decisiones. De manera general los pasos para la aplicación de AC son: 1) obtener una matriz con  $n$  casos (p.e huertos) por  $n$  variables (p.e edad, variedad, incidencia, etc). En esta matriz, los datos pueden ser de intervalo donde todas las variables son cuantitativas, medidas en escala de intervalo; de frecuencia, donde las variables analizadas son categóricas de forma que, por filas, se tienen objetos o categorías de objetos y, por columnas, las variables con sus diferentes categorías; datos binarios, en las que las variables analizadas son binarias de forma que 0 indica la ausencia de una característica y 1 su presencia. 2) Una vez establecidas las variables y los objetos a clasificar el siguiente paso consiste en establecer una medida de proximidad o de distancia entre ellos que cuantifique el grado de similitud entre cada par de objetos (p.e el coeficiente de la distancia Euclidiana). 3) representar la estructura jerárquica de la formación de los conglomerados en un dendograma.

## **Tipos de agrupamiento**

Existen muchos tipos de métodos de análisis de conglomerados, por ejemplo el SAS ofrece 11 tipos de agrupamientos. Entre los muchos tipos de métodos que existen en la literatura los cinco más utilizados son los siguientes: 1) método del centroide, el cual mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia entre sus centroides, 2) método de encadenamiento simple (del vecino más próximo), mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia entre sus objetos más próximos o la similitud entre sus objetos más semejantes, 3) método de encadenamiento completo (del vecino más distante), mide la proximidad entre dos grupos calculando la distancia entre sus objetos más lejanos o la similitud entre sus objetos menos semejantes, 4) método de encadenamiento promedio, mide la proximidad entre dos grupos con la distancia media existente entre los

miembros del grupo unión de los dos grupos, y 5) método de Ward, busca minimizar las sumas de cuadrados intragrupos.

Para la elección del número de grupos existen diversos métodos de determinación: algunos están basados en reconstruir la matriz original, otros en los coeficientes de concordancia de Kendall y otros realizan análisis de varianza entre los grupos obtenidos. No existe un criterio universalmente aceptado. Sin embargo, se debe definir el nivel de distancia a la cual se deben conformar los grupos, ya que el nivel de similitud en la cual se corta el dendograma determinará el número de clases en una clasificación y establecerá una clara discriminación de los grupos (Cortez-Madrigal *et al.*, 2003). Dado que la mayor parte de los paquetes estadísticos proporcionan las distancias de aglomeración, es decir, las distancias a las que se forma cada grupo, una forma de determinar el número de grupos consiste en localizar en qué interacciones del método utilizado dichas distancias pegan grandes saltos. La formación de los conglomerados se puede basar en: a) en la raíz cuadrada media de la desviación estándar, b)  $r^2$  cuadrada, c)  $r^2_{sp}$  semi-parcial y d) Distancia cuadrada entre conglomerados ( $Dist^2$ ).

### ***Aplicación en fitopatología***

En un estudio donde se midieron nueve parámetros epidemiológicos como la incidencia inicial y final, la forma de la curva, la duración de la epidemia, el área bajo la curva, entre otros, de 60 curvas de progreso de la enfermedad del virus de la mancha anular del papayo con el objetivo de caracterizar cada una de ellas. Con el análisis cluster se definieron cinco categorías epidémicas a través de la obtención de componentes principales asociados con el área bajo la curva, forma de la curva, y el tiempo entre la fecha de trasplante y síntomas iniciales (Mora-Aguilera, *et al.*, 1996)

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Análisis y colección de datos históricos a nivel regional

De abril a mayo de 2010 se realizó la validación de los huertos históricos con relación a la presencia o erradicación de árboles positivos a CTV reportados por los CESV de la Península de Yucatán, validándose así un total de 2792 árboles positivos en los tres estados. Se analizaron las bitácoras de campo, para generar bases de datos para su uso en los análisis epidemiológicos. En cada huerto se verificó y completó la georeferenciación. La selección de unidades regionales se realizó utilizando los datos de superficie citrícola por municipio de Yucatán, Campeche y Quintana Roo (SIAP, 2008). Además, en cada municipio se registró el número de positivos por huertos y niveles de riesgos obtenidos mediante un procedimiento de interpolación de la incidencia de la enfermedad. A estas variables, se les asignaron valores ponderativos; al municipio con menor superficie se le asignó el valor de 1 y al mayor el valor de 4. Similarmente, se aplicó el mismo criterio para las otras dos variables. En los niveles de riesgos, los valores ponderativos más altos se dieron a las zonas con alta intensidad de la enfermedad interpolada. Se consideraron 50 sitios de muestro. Con los datos definidos del factor de ponderación total y el número total de sitios por muestrear, se estimó el número de muestras por municipio con la siguiente ecuación (Ceja-Torres *et al.*, 2003):

$$n_i = N \frac{(S_{wi})(A_{wi})(P_{wi})}{\sum(S_{wi}A_{wi}P_{wi})}$$

donde:  $n_i$ =número de muestras por municipio;  $N$  = número total de muestras, definido por disponibilidad de recurso humano;  $S_{wi}$ = ponderación de la superficie de los municipios- $i$ , y  $w=1, \dots, 4$ ;  $A_{wi}$ = ponderación del número de positivos por número de huertos- $i$ , y  $w=1, \dots, 4$ ;  $P_{wi}$ =ponderación de los niveles de riesgo- $i$ , y  $w=1, \dots, 4$ .

### 3.2. Colecta y análisis serológico

Se colectó material vegetal de 1529 árboles, dos brotes con hojas jóvenes de los cuatro puntos cardinales del dosel del árbol, a una altura de 1.50 m (12332 inmunopresiones) (Rivas-Valencia *et al.*, 2008). Las muestras fueron etiquetadas y conservadas a 4°C, hasta su procedimiento con el kit serológico de inmunopresión-ELISA usando el protocolo del fabricante y la metodología de muestreo propuesta por Ruiz-García *et al.*, 2009.

### 3.3. Análisis Temporal del CTV

La incidencia del CTV (número de plantas positivas mediante inmunopresión en proporción al total de observadas) de cada huerta fue calculada para cada año (Cuadro 5). La adecuación de las formas linealizadas de los modelos lineales clásicos Exponencial, Logístico, Gompertz y Monomolecular fueron examinados por análisis de regresión lineal de los datos de incidencia transformados. Los resultados preliminares del análisis de regresión lineal mostraron la selección de parámetros para el análisis de regresión no lineal. El análisis de regresión no lineal de cada huerta fue realizado para el estudio del progreso de la enfermedad a partir de exploración gráfica de los parámetros de forma de la curva. En adición, el modelo de Weibull en su versión simplificada con dos parámetros fue ajustado para el conjunto de datos (Mora-Aguilera *et al.*, 1996). Los parámetros de la tasa de crecimiento en su forma inversa ( $b$ ) y la forma de la curva ( $c$ ) de este último modelo fueron estimados por el método no derivativo DUD y con el procedimiento PROC GLM y el PROC NLIN en el programa SAS versión 9.0 para ajustar el modelo al conjunto de datos de progreso de CTV con relación al tiempo. La adecuación de ajuste del modelo fue determinado al examinar la suma de cuadrados del error, el estimador de los parámetros  $c$  y  $b$ , y el coeficiente de determinación del análisis de regresión ( $r^2$ ) (Ribeiro *et al.*, 2004). Los modelos

fueron seleccionados basados en los atributos sobre la forma de la curva del progreso de la enfermedad.

**CUADRO 5.** Incidencia temporal de las siete huertas censadas en la Península de Yucatán considerando incidencias acumuladas.

Estado	Mpio	Huerto	<sup>z</sup> Positivos	<sup>z</sup> Positivos	<sup>z</sup> Positivos	<sup>z</sup> Positivos	<sup>y</sup> Positivos	Incide. Acum.
			2003	2005	2006	2007	2011	
			Muestreo	Muestreo	Muestreo	Muestreo	Muestreo	
			10%	10%	100%	100%	100%	
Yucatán	Kinchil	San Manuel 2	-	3(0.9)	75(24.9)	-	109	36.2
	Samahil	San jose (kuchel)	-	2(0.6)	75(25.7)	-	105	36.0
	Dzan	Yoh but 4	-	11(4.26)	64(24.8)	-	71	27.5
		Esperanza 4	-	2(0.59)	17(5)	-	70	20.7
Campeche	Camp	San A. Cayal	10(5.7)	-	-	-	34	19.4
		Castamay	-	-	-	2(1.5)	6	4.7
Q Roo	O.P.B	J. Rojo Gómez	-	-	1(2.5)	-	1	2.5

<sup>z</sup> Datos validados de los Comités Estatales de Sanidad Vegetal.

<sup>y</sup> Censos realizados para detección del CTV en 2011

### 3.4. Análisis espacial del CTV

Para evaluar la dispersión del CTV, se realizaron análisis de las relaciones entre plantas con síntomas en dos niveles de jerarquía espacial. El análisis consistió en mapear el área a partir de plantas sanas y enfermas con el propósito de examinar: la distribución de plantas enfermas mediante índices (Morisita y Lloyd) y la autocorrelación espacial entre plantas con árboles infectados en las huertas.

**Índices de dispersión.** Se realizaron para examinar la relación entre plantas enfermas dentro de cuadrantes. Con los datos de incidencia de árboles positivos a CTV, se construyeron mapas de dispersión de la tristeza de los cítricos en el programa Surfer ver 8.0. Se calcularon, para cada huerta, los índices de agregación de Morisita (Morisita, 1959) y Lloyd (Lloyd, 1967) dependientes del tamaño óptimo de cuadrante (TOC) propuesto por Greig (Greig, 1952). Para cada cuadrante se determinó la proporción de plantas infectadas y la varianza fue calculada y usada para obtener los índices de dispersión en el programa MorLloyd ver. 1.0 (Rivas-Valencia *et al.*, 2010).

**Autocorrelación espacial.** La dependencia espacial entre la condición de enfermas a nivel planta fueron examinadas con el análisis de autocorrelación espacial (Rivas-Valencia *et al.*, 2010). La condición enferma o sana por árbol se usó como variable, permitiendo determinar la intensidad y orientación de agregación usando el programa LCOR (Gottwald *et al.*, 1992).

### **3.5. Colecta e identificación de áfidos**

Los áfidos se colectaron de brotes de enero-marzo y trampas amarillas ubicadas en seis sitios de la Península de Yucatán (3 Yucatán, 2 Campeche, 1 Quintana Roo) en el periodo de julio de 2010 a mayo de 2011. Los especímenes fueron procesados en el Laboratorio de Entomología del Colegio de Postgraduados, donde se separaron individualmente e identificaron con claves taxonómicas de áfidos especializadas y con la confirmación de la M.C Rebeca Peña.

### **3.6. Selección de unidades para el estudio regional**

Las 34 huertas previamente descritas fueron empleadas para el estudio regional. Además, de las variables previamente enlistadas, en este estudio se adicionaron; brotes maduros y tiernos (enero-marzo 2011), infestación del vector, tipo de riego, pedregosidad y temperatura mínima de la media diaria de enero y febrero (periodo de brotación) del periodo 2008-2010. Con el propósito de generar mapas geoestadísticos las parcelas fueron georeferenciadas con el instrumento Garmin *Etrex*. Previamente se indicó que estas unidades fueron obtenidas por criterios ponderativos (ver Sección Análisis y colección de datos históricos a nivel regional). La base de datos y los criterios ponderativos empleados, así como el esquema de análisis se muestra en el Anexo 1.

### 3.7. Análisis de datos para el estudio regional

A las huertas se les realizó un análisis de componentes principales y de factores (ACP y AF), para determinar que variables e índices multivariados fueron las más inductivas a la enfermedad con el programa SAS ver. 9.0 con el PROC PRINT y PROC FACTOR. Las variables seleccionadas como más inductivas a la enfermedad de las huertas se utilizaron para realizar un análisis de conglomerados con el PROC CLUSTER (método average), para la formación de grupos de parcelas. Además, la incidencia de la enfermedad fue interpolada por el método inverso a la distancia al cuadrado con el programa ArcGis ver. 9.2. Este mismo procedimiento se siguió para la determinación de la enfermedad y para determinar zonas de riesgos del CTV a nivel peninsular. Los programas y análisis utilizados se muestran en el recuadro inferior.

Programa	Análisis
SAS Ver. 9.0	Componentes Principales
SAS Ver. 9.0	Conglomerados
SAS Ver. 9.0	Interpolación Geoestadística

### 3.8. Caracterización molecular del CTV

Con el propósito de estudiar la estructura poblacional del CTV a nivel de huerto y establecer el posible efecto de TC en cambios estructurales del virus se realizó la técnica de SSCP. Para este fin se amplificó una parte del gen p25 que codifica a la capa proteica en el extremo 3' (273 pb) utilizando los iniciadores específicos (Kong *et al.*, 2000). El producto de la amplificación se analizó en gel de poliacrilamida al 12% 120 min a 300 v y se tiñó con plata al 0.2% (SSCP) (Rivas-Valencia *et al.*, 2010). El procedimiento general es el mismo al empleado por Rivas (2008) y Loeza (2008) en trabajos previos con CTV en el Colegio de Postgraduados (Grupo Interdisciplinario Interinstitucional de Investigación en Cítricos-GIIC-).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 4.1. Análisis regional de la dispersión histórica del CTV

Se validaron 2972 árboles positivos a CTV en los tres estados de la Península de Yucatán. A nivel regional el mayor número de árboles positivos se encontró en el estado de Yucatán (1791 árboles enfermos), siendo los municipios de Dzan y Ticul los que representaron el mayor riesgo de dispersión (Cuadro 6). El municipio de Campeche representó otra zona importante de árboles enfermos (870 positivos de un total de 1139). Quintana Roo presentó un bajo número de árboles positivos.

**CUADRO 6.** Árboles de cítricos positivos a CTV en la Península de Yucatán del 1999 al 2008

Municipio	Cítricos positivos al CTV por año <sup>z</sup>									Total Municipio	Total Estado <sup>y</sup>
	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007		
<b>Campeche</b>											1139
Escárcega	0	0	0	0	0	0	14	0	2	16	
Chamotón	0	0	0	0	0	5	113	0	15	133	
Campeche	50	0	0	0	53	63	642	0	62	870	
Hopelchen	0	0	0	0	8	0	0	0	0	8	
Tenabo	0	0	0	0	0	11	2	0	32	45	
Calkiní	0	0	18	0	0	37	0	0	9	64	
Hecelchakán	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	
<b>Yucatán</b>											
Kinchil	0	0	0	0	0	0	275	149	0	424	1791
Samahil	0	0	0	0	3	0	151	8	0	162	
Hunucma	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	
Muna	0	0	0	0	1	0	26	1	10	38	
Uman	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	
Sacalum	0	0	0	0	2	0	4	0	0	6	
Ticul	0	0	0	0	108	0	110	189	37	444	
Dzan	0	0	0	0	3	0	661	0	25	689	
Oxkutzcab	0	0	0	0	0	0	2	0	4	6	

<b>Mani</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3
<b>Akil</b>	0	0	0	0	2	0	3	0	0	5
<b>Motul</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>Telch-Pueblo</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>Tekax</b>	0	0	0	0	0	0	2	0	3	5
<b>Quintana Roo</b>										37
<b>O.P.B.</b>	0	0	0	0	0	0	0	29	3	32
<b>J.M.M.</b>	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2
<b>F.C.P.</b>	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
<b>L. Cárdenas</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

<sup>z</sup> La detección de los árboles fue a través de la técnica DAS-ELISA e Inmunoimpresión-ELISA.

<sup>y</sup> Se incluyen árboles positivos hasta el 2008 de Campeche, Quintana Roo y Yucatán.

Se seleccionaron 34 huertas mediante criterio ponderativos para muestreos restrictivos a focos de la enfermedad (Cuadro 7).

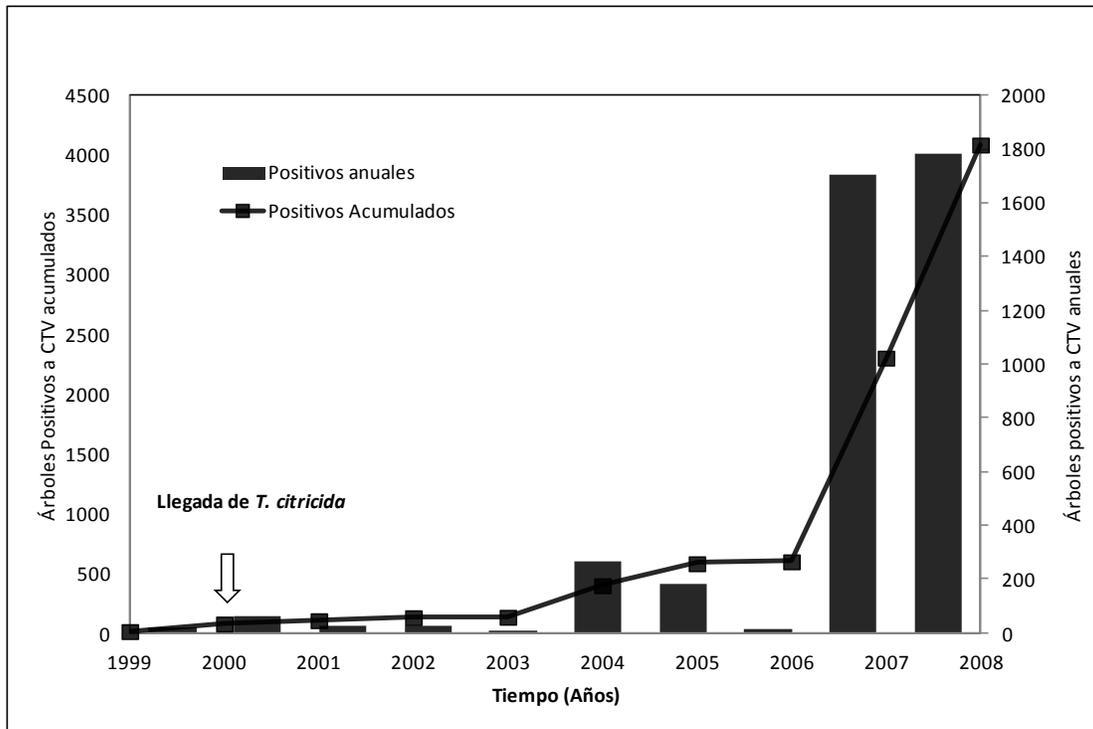
**CUADRO 7.** Caracterización de huertos cítricos comerciales y árboles positivos históricos a CTV en la Península de Yucatán en 34 unidades productoras seleccionadas por un muestreo ponderativo.

Estado	Mpio	Localidad	Patron	Arboles/				No. Positivos <sup>z</sup>
				huerta	Edad	Citrico	Dens/Plant	
Q Roo	Othón P.B.	Subtte Lopez	Agrio	400	15	Valencia	5X5	24
	<b>Othón P. B.</b>	<b>JR Gomez</b>	<b>Agrio</b>	<b>556</b>	<b>20</b>	<b>Valencia</b>	<b>6X6</b>	<b>1</b>
	Othón P. B.	Cacao	Agrio	1111	35	Valencia	6X6	1
Campeche	Hopelchen	Suc Tuc	Volka	1518	10	Limón P.	8X7	4
	Campeche	San A. Cayal	Agrio	370	10	Limón P.	9X6	1
	Campeche	San A. Cayal	Agrio	278	20	Valencia	9X8	27
	<b>Campeche</b>	<b>San A. Cayal</b>	<b>Agrio</b>	<b>175</b>	<b>20</b>	<b>Valencia</b>	<b>9X8</b>	<b>10</b>
	Campeche	San A. Cayal	Agrio	278	20	Valencia	9X8	6
	Campeche	San A. Cayal	Agrio	185	18	Valencia	9X6	3
	Campeche	San Ao Cayal	Agrio	185	15	Limón P.	9X8	1
	<b>Castamay</b>	<b>Castamay</b>	<b>Cleopatra</b>	<b>127</b>	<b>10</b>	<b>Limón P.</b>	<b>8X8</b>	<b>2</b>
	Champoton	Revolucion	Agrio	317	22	Valencia	9X7	36
	Champoton	Revolucion	Agrio	159	30	Valencia	9X7	12
	Champoton	Revolucion	Agrio	238	20	Valencia	9X7	6
Champoton	Villamadero	Cleopatra	159	25	Mandarina	9X7	6	

	Champoton	Revolucion	Agrio	238	30	Valencia	9X7	8
	Calkini	UP Such	Agrio	3000	25	Valencia	10X5	8
	Kinchil	Bobadilla	Agrio	278	25	Valencia	9X8	1
	<b>Kinchil</b>	<b>San Manuel 2</b>	<b>Agrio</b>	<b>301</b>	<b>25</b>	<b>Valencia</b>	<b>7X6</b>	<b>9</b>
	Kinchil	San Manuel 2	Agrio	1190	25	Valencia	7X6	3
	Kinchil	Diaz Ordaz	Agrio	750	15	Valencia	5X8	1
	Samahil	Buenaventura 1	Agrio	278	26	Valencia	9X8	1
	Samahil	San Luis	Agrio	714	25	Valencia	7X6	1
	<b>Samahil</b>	<b>Kuchel</b>	<b>Agrio</b>	<b>291</b>	<b>30</b>	<b>Valencia</b>	<b>8X6</b>	<b>2</b>
	<b>Dzan</b>	<b>Esperanza 4</b>	<b>Agrio</b>	<b>337</b>	<b>20</b>	<b>Valencia</b>	<b>7X6</b>	<b>2</b>
Yucatán	Dzan	Plan Chac 7	Agrio	278	25	Valencia	9X8	1
	Dzan	Yoh But 1	Agrio	408	15	Valencia	7X7	2
	Dzan	Yoh But 1	Agrio	536	25	Valencia	7X8	1
	<b>Dzan</b>	<b>Yoh But 4</b>	<b>Agrio</b>	<b>258</b>	<b>30</b>	<b>Valencia</b>	<b>9X7</b>	<b>11</b>
	Ticul	Union 3	Agrio	536	20	Valencia	8X7	1
	Ticul	Union 2	Agrio	278	20	Valencia	9X8	3
	Ticul	Cabache 2	Agrio	816	30	Valencia	7X7	1
	Muna	Muna 1	Agrio	556	10	Valencia	9X8	1
	Muna	Muna 3	Agrio	469	30	Valencia	8X8	1

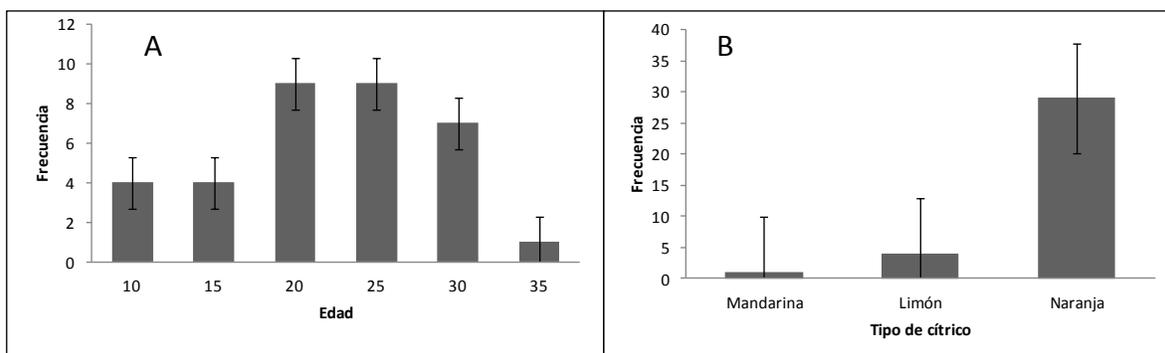
<sup>z</sup> La detección árboles positivos fue realizada por los CESV utilizando la técnica serológica de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) e inmunopresión-ELISA como lo establecía la norma correspondiente.

El progreso de la enfermedad tuvo un comportamiento exponencial de 1999 a 2008 durante la operación de la Campaña contra el CTV (NOM-031-FITO-2000). Sin embargo, la incidencia final ( $y_f=4091$  árboles positivos) representó un bajo nivel de incidencia acumulada (0.00005%) (Fig. 10) con respecto a la población estimada de árboles de la Península Yucatán, indicando que la infestación de TC no tuvo el impacto en la dispersión del CTV como se ha reportado en otros países (Garnsey, *et al.*, 2000). Similarmente, Loeza y Rivas observaron que la ocurrencia nula de aislamientos de tipo severo presentes en México (Loeza *et al.*, 2005; Rivas-Valencia *et al.*, 2008) es diferente a lo que se ha observado en otros países en picado del tallo y declinamiento (Halbert *et al.*, 2003).



**FIGURA 10.** Progreso temporal de la dispersión histórica del CTV de 1999 a 2008 en la Península de Yucatán bajo la operación de la norma NOM-031-FITO-200.

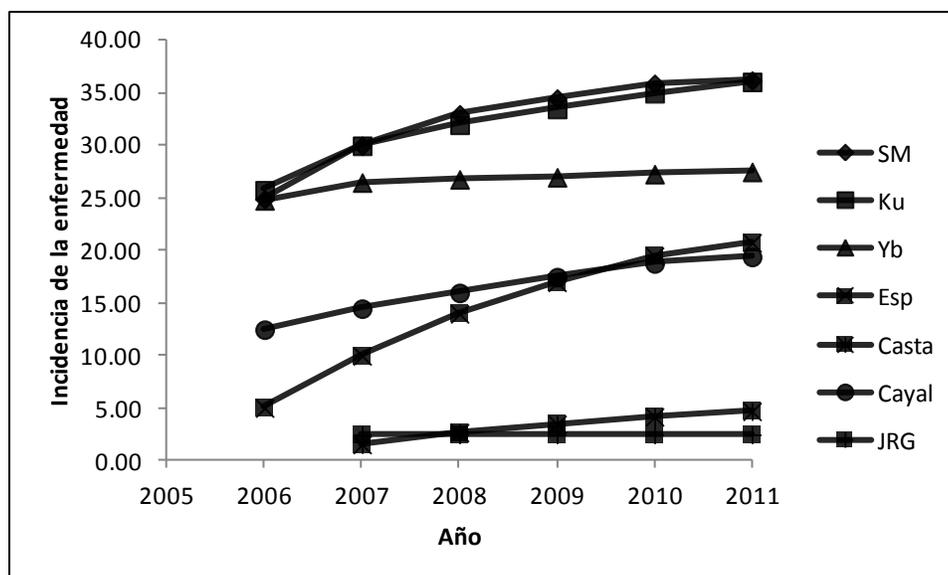
La incidencia de CTV predominó en naranja dulce sobre mandarina y limón persa por su mayor abundancia en unidades productivas. La posible causa de dispersión incluye la tipología de producción, que aunque predomina el patrón naranjo agrio, las plantas exhiben una reducción de vigor y edad de 20 a 25 años (Fig. 11).



**FIGURA 11.** Frecuencia de variables asociadas a la incidencia de la enfermedad. Edad de la planta (A), tipo de cítrico (B) en huertas de cítricos en la Península de Yucatán.

#### 4.2. Análisis temporal del progreso de la enfermedad

Las epidemias estudiadas a nivel parcela, corroboraron lo encontrado en el análisis regional de la dispersión histórica del CTV. El progreso temporal para todas las huertas estudiadas, avanzaron a lo largo de varios años con una proporción inicial de plantas enfermas menor al 6% (Fig. 12), con excepción del huerto J Rojo Gómez el cual mantuvo el mismo nivel de incidencia cinco años después del primer reporte. Sin embargo, para Campeche y Yucatán el progreso de la enfermedad se presentó en una fase logarítmica a seis años del primer reporte con una incidencia final de 36%. Las tasas de infección aparente de las epidemias de Yucatán indican mayor intensidad de la enfermedad que en Campeche (Cuadro 8). La menor disponibilidad de cítricos y/o la menor abundancia de vectores aparentemente redujeron significativamente la tasa de infección del CTV en cítricos. Así también, el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) fue calculada para corroborar la intensidad de dispersión de la enfermedad a nivel regional.



**FIGURA 12.** Progreso temporal de la tristeza en siete huertas cítricas de la Península de Yucatán. La incidencia para todos los árboles de cada huerta se evaluó con Inmunoimpresión-ELISA.

El modelo de Weibull ajustó las curvas de progreso temporal de la enfermedad con buenos atributos estadísticos de diferente forma y estructura (Mora-Aguilera *et al.*, 2003). El modelo flexible permitió mejor ajuste de todas las epidemias ( $r^2 > 0.86$ , en 6/6 epidemias), en comparación con los modelos clásicos, los cuales ajustaron solamente aquellas epidemias que presentaron características estructurales específicas a cada modelo (datos no mostrados).

**CUADRO 8.** Parámetros asociados a curvas del progreso para seis epidemias de *Citrus tristeza virus* en cítricos, en la Península de Yucatán.

Huerto (epidemia)	Modelo Weibull <sup>z</sup>					ABCPE	Y <sub>0</sub> <sup>x</sup>	Y <sub>f</sub> <sup>x</sup>
	$y=1-e[-(t/b)c]$	$c$	$1/b$	Signif. $b$	$r^{2y}$			
Castamay	$y=1-e[-(t/1229)0.68]$	0.68	0.001	d	0.99	4.06	1.5	4.7
San A. Cayal	$y=1-e[-(t/193.3)0.68]$	0.68	0.005	c	0.99	33.03	5.7	19.4
Esperanza 4 San J.	$y=1-e[-(t/101.3)0.138]$	1.38	0.010	b	0.98	21.41	0.59	20.7
Kuchel San Manuel	$y=1-e[-(t/33.4)1.42]$	1.42	0.030	a	0.86	51.99	0.6	36.0
2	$y=1-e[-(t/32.23)1.54]$	1.54	0.031	a	0.89	52.59	0.9	36.2
Yoh But 4	$y=1-e[-(t/57.56)0.99]$	0.99	0.017	a	0.92	39.59	4.2	27.5

<sup>z</sup> Los parámetros del modelo se estimaron por regresión no lineal con la ecuación  $y=1-e[-(t/b)c]$  del modelo de Weibull, donde  $c$  y  $b$  son parámetros de tasa,  $y$  es la enfermedad medida como incidencia de los árboles enfermos, y  $t$  es el tiempo en años.

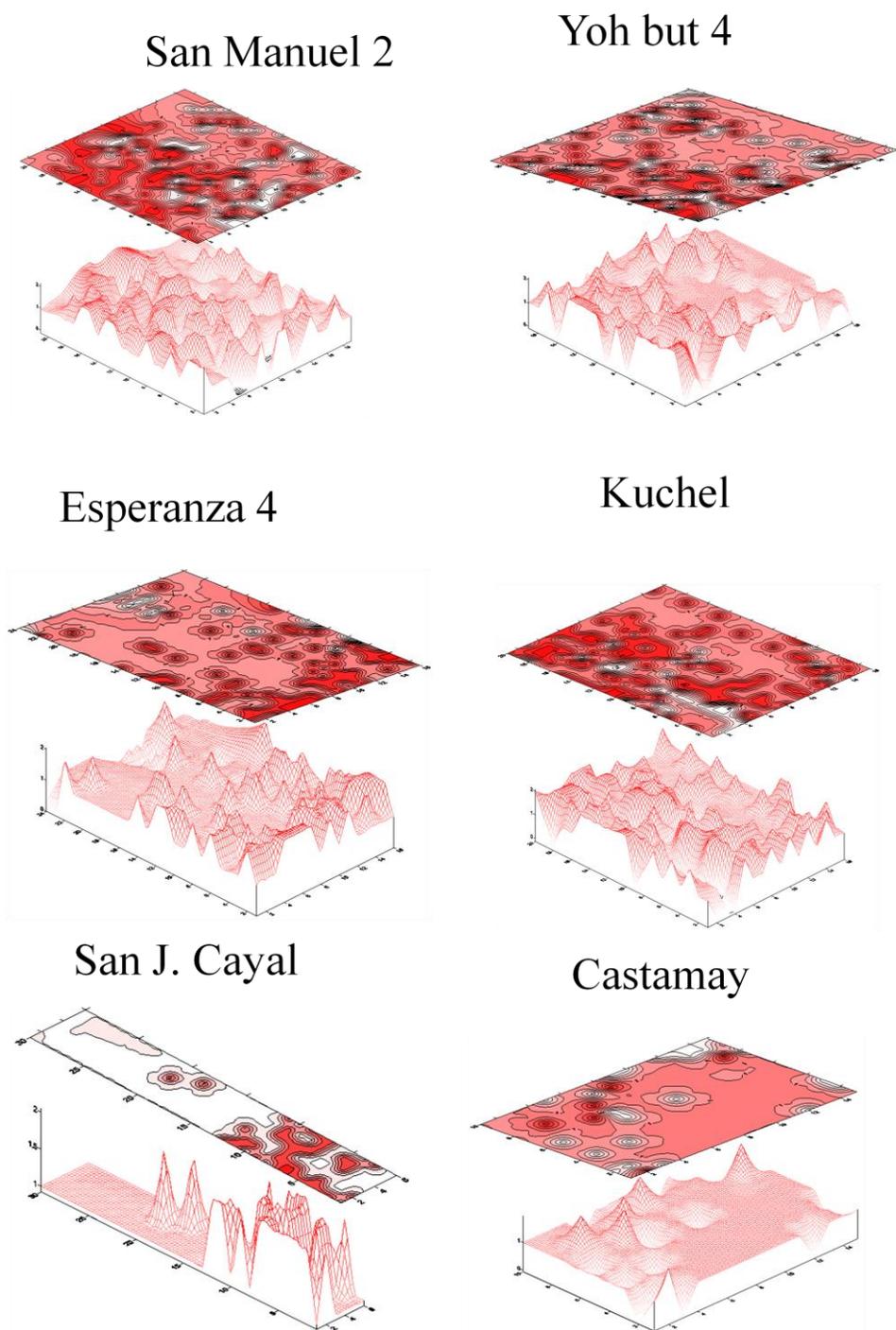
<sup>y</sup>  $r^2$  = Coeficiente de determinación de correlación de valores predichos contra valores reales para adecuación de ajuste del modelo.

<sup>x</sup> Parámetros de localización de las curvas de la enfermedad calculados en porcentaje.

#### 4.3. Análisis del arreglo espacial de árboles enfermos

Con los mapas generados de cada huerto se detectó direccionalidad de dispersión de la enfermedad, tamaño y forma de los patrones de los árboles enfermos (Fig. 13). Cada una de las características proporciona evidencias de los procesos fundamentales de dispersión de la enfermedad en espacio con relación a los

subsistemas epidemiológicos, por ejemplo manejo y presencia del vector que podrían influenciar directamente en la dispersión de la enfermedad.



**FIGURA 13.** Mapas de interpolación geostatística de árboles positivos a CTV correspondientes a huertos de cítricos de la Península de Yucatán.

Los índices de dispersión determinaron un patrón en agregados para 1 de los 6 huertos estudiados determinando la alta incidencia asociada a patrones uniformes. La no erradicación en algunas de las huertas y la presencia del vector influyó para que de un patrón agregado pase a uniforme.

Los resultados obtenidos muestran valores notoriamente altos de dispersión en plantaciones comerciales de cítricos de la Península de Yucatán.

La interpretación de los índices de los valores de dispersión sugiere un tipo de patrón agregado-uniforme de árboles positivos a CTV de las huertas estudiadas. Las parcelas San Manuel 2, Kuchel, Yoh but 4, Cayal y Castamay presentaron un patrón uniforme con rangos de 0.8908-0.9997 y 0.8878-0.9996 para Morisita y Lloyd respectivamente. La huerta Esperanza 4 presentó un patrón agregado con 1.0326 y 1.0391 para Morisita y Lloyd respectivamente (Cuadro 9). En tres de los huertos con patrón uniforme se detectó la mayor incidencia (27.5-36.2%), los cuales pertenecen al estado de Yucatán y sugiere que la erradicación en años anteriores en esos huertos determinó el tipo de patrón espacial. Con respecto a la huerta Esperanza 4, ambos índices confirmaron de manera cuantitativa la disposición espacial en agregado de árboles con CTV en presencia de TC. Este comportamiento fue identificado también en Costa Rica y Republica Dominicana por Garnsey *et al.*, (2000). Sin embargo, en México, a once años de la introducción del vector, las huertas estudiadas, no presentaron agregados ni epidemias intensas, pero si contribuyeron en la diseminación intraparcularia. Además, los estudios en trampas amarillas sugieren que aparentemente *A. spiraecola* es el encargado de la diseminación de la enfermedad a largas distancias al presentar mayor movilidad.

**CUADRO 9.** Tamaño óptimo del cuadrante, índices de Morisita y Lloid y tipo de patrón espacial del CTV, para seis huertas de la Península de Yucatán.

Huertas	Incidencia (%)	(TOC) <sup>z</sup>	Índices		Tipo de patrón <sup>y</sup>	Análisis de autocorrelación espacial <sup>x</sup>	
			Morisita	Yoid		Dentro	Entre
San Manuel 2	36.2	T64	0.9983	0.9966	Uniforme	D4**	D7**
Kuchel	36	T32	0.9969	0.9959	Uniforme	D3*	C1**
Yoh but 4	27.5	T32	0.9997	0.9996	Uniforme	D1	D3*
Esperanza 4	20.7	T32	1.0326	1.0391	Agregado	C9**	C9**
Cayal	19.4	T2	0.8908	0.8878	Uniforme	C4**	C3**
Castamay	4.7	T4	0.8966	0.8919	Uniforme	D2	D3*

<sup>z</sup> Tamaño óptimo de cuadrante.

<sup>y</sup> Valores mayores a 1=agregado, iguales a 1=aleatorio y menores a 1=uniforme.

<sup>x</sup> C y D, representan una dependencia espacial continua y discontinua, respectivamente; los números indican el grado u orden de dependencia; \* = nivel de significancia 0.05; \*\* = nivel de significancia 0.01

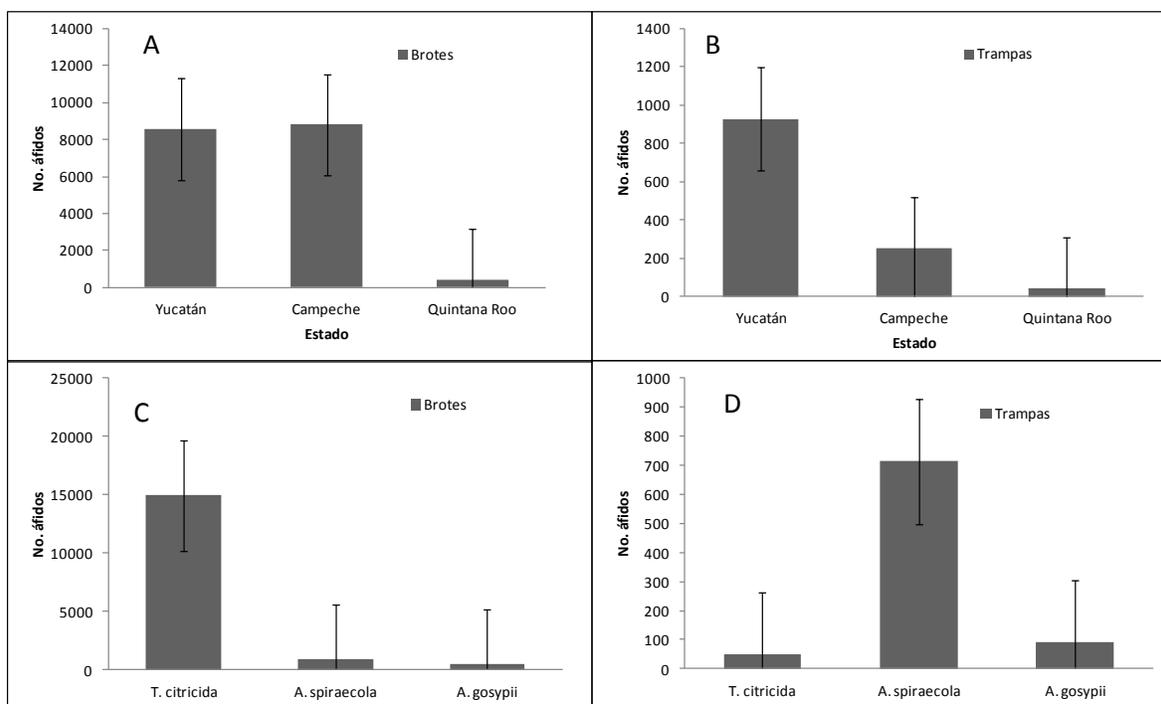
La baja diseminación en la huerta de Quintana Roo, puede deberse a que en el año 2006 el Gobierno Federal a través del CESV llevó a cabo actividades de eliminación de plantas positivas a CTV en la huerta estudiada (SENSICA 2008). Lo anterior está fundamentado en los programas de erradicación que se han llevado en otros países, donde se ha documentado que cuando la ocurrencia del virus es inferior al 5%, las campañas de eliminación de árboles infectados reducen considerablemente las tasas de diseminación del virus en el campo (Polek, 2000). Otra posible explicación de la baja ocurrencia y diseminación podría ser por el manejo agronómico y los vectores presentes que pudiera reflejarse en una baja transmisibilidad de aislamientos (Loeza-Kuk *et al.*, 2008). Existen reportes en varios lugares del mundo donde focos de infección pequeños a nivel de campo se han mantenido sin transmisión natural por áfidos durante periodos largos (Cartia *et al.*, 1980) y hasta por 18 años (Ebrahimi *et al.*, 1988).

Considerando que el principio de erradicación no se realizó en Yucatán y Campeche debido a que al elevado número de positivos hacía inviable la

erradicación, además de la mayor abundancia de los vectores y manejo agronómico principalmente factores edáficos. Por lo tanto, estos tres factores pudieron haber sido los inductivos en determinar la mayor incidencia en estos estados.

#### **4.4. Identificación de áfidos**

Se identificaron y cuantificaron a nivel especie los ejemplares reportados como vectores de virus y en particular de CTV (Fig. 14). La mayor abundancia de vectores se encuentra en los estados de Yucatán y Campeche tanto en brotes como en trampas (17,364; 1183), mientras que para Quintana Roo la abundancia es menor (426, 39). Entre las especies que se han reportado como vectores del CTV a nivel mundial (Raccah *et al.*, 1989) se encontró con mayor abundancia a *A. spiraecola* en trampas amarillas con 713, lo cual sugiere que la movilidad a grandes distancias le corresponde a esta especie y no a *A. gossypii* (92) como se reporta en otros lugares. Sin embargo, la especie más abundante por muestreo directo en follaje correspondió a TC con 14,929, aunque no necesariamente determinando un patrón agregado, ni causando epidemias de alta intensidad.



**FIGURA 14.** Poblaciones de áfidos encontrados en huertas de cítricos de la Península de Yucatán de Junio 2010 a mayo 2011 (A y B). Especies de áfidos en trampas amarillas en huertas de cítricos en la Península. 2010-2011 (C y D).

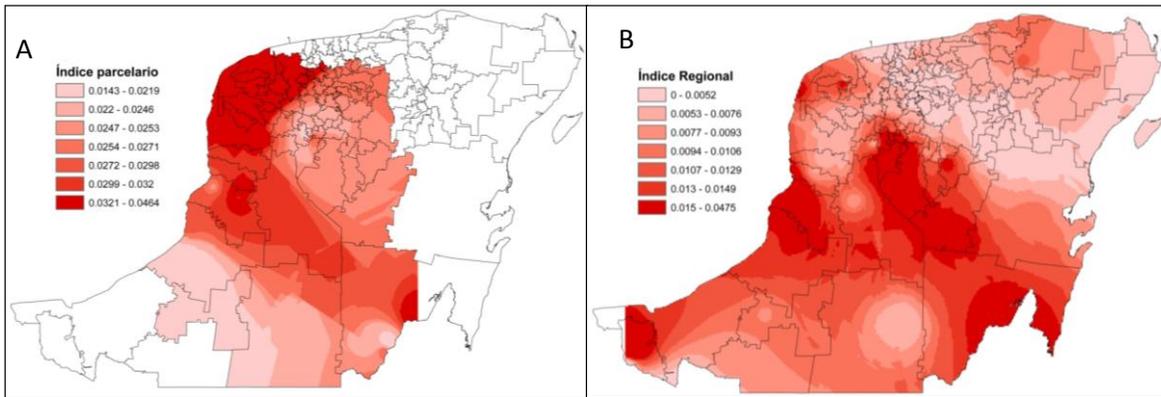
#### 4.5. Selección de unidades para el estudio regional

Mediante el análisis geoestadístico de la incidencia se obtuvieron dos índices multivariados:

**1. Índice multivariado subregional.** Cuatro componentes principales fueron seleccionados con base a los Eigenvalues que explicaron el 67% de la varianza con cuatro variables con base a sus valores propios (1.12) y a sus valores acumulados, como se indica en el recuadro inferior.

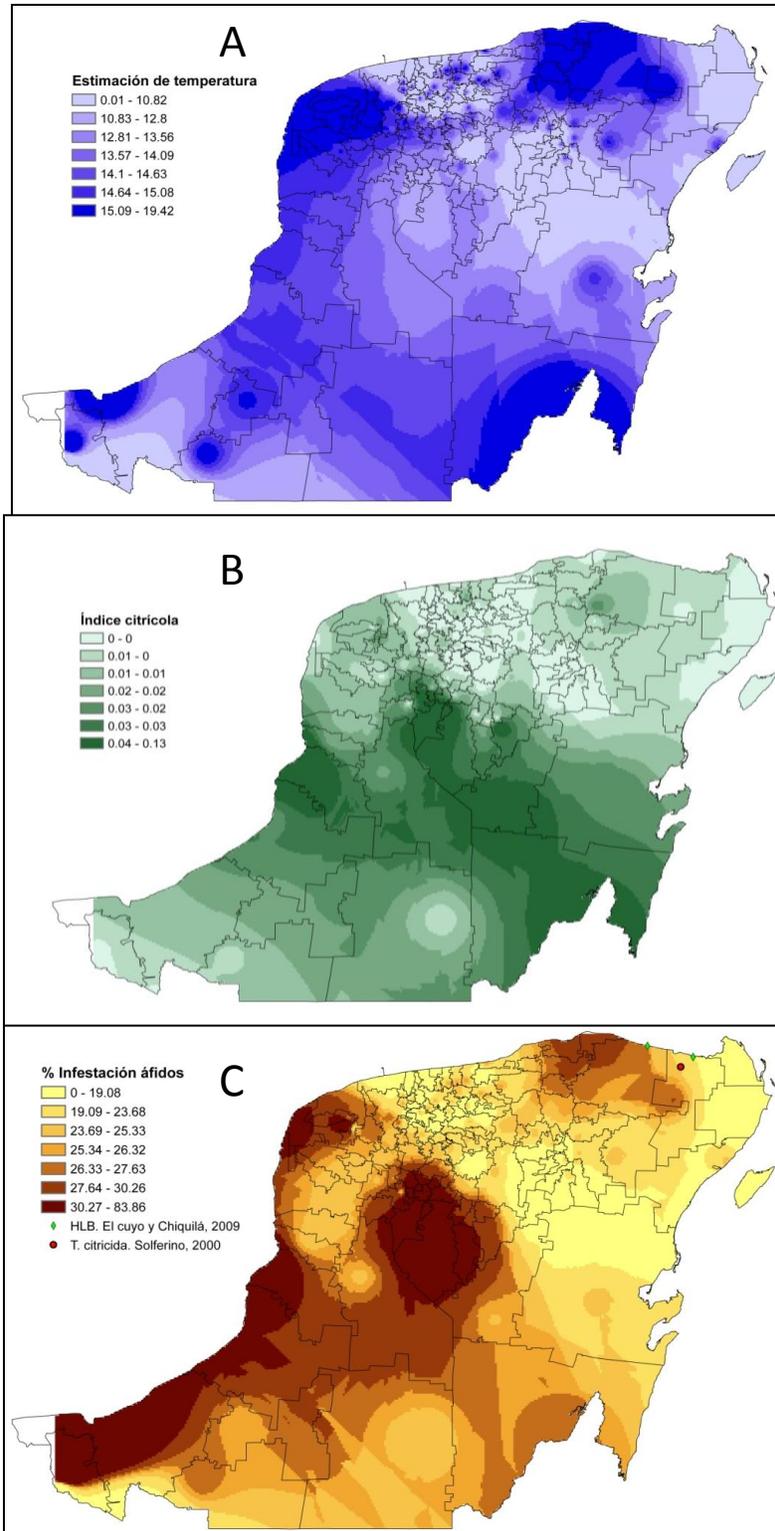
Componente	Valor propio	Diferencia	Proporción	Acumulada	Variable
1	1.7	0.29	0.21	0.21	Densidad de plantación
2	1.41	0.22	0.17	0.39	Temperatura
3	1.18	0.05	0.14	0.53	Brotos tiernos
4	1.12	0.15	0.14	0.67	Infestación del vector

Con estos componentes se calculó un índice ponderado con la varianza, el cual fue empleado para generar un mapa de riesgo con variables de manejo para su aplicación en áreas de dispersión activa del CTV (Fig. 15)



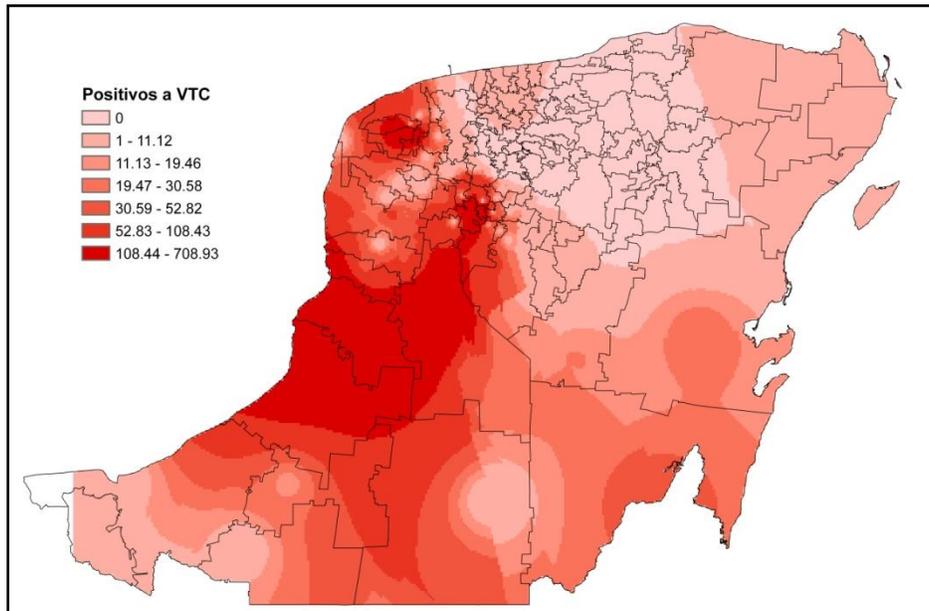
**FIGURA 15.** Mapas interpolados de índices de riesgo epidemiológico en la Península de Yucatán. (A) Parcelario (34 huertas) y (B) Regional.

**2. Índice Multivariado Peninsular.** Este índice se generó con tres componentes principales asociados a las variables índice citrícola, temperatura mínima e infestación del vector. Este índice estableció niveles de riesgo del CTV sin considerar variables de enfermedad (Fig. 16).



**FIGURA 16.** Mapas interpolados de Península de Yucatán. (A) Temperatura mínima de enero y febrero; (B) Densidad citrícola; (C) Infestación de *T. citricida*.

El mapa de positivos históricos validados de 1999-2007 se comparó con el mapa de riesgo subregional y peninsular. Se puede notar que tienen alta similitud con el de enfermedad (Fig. 17).

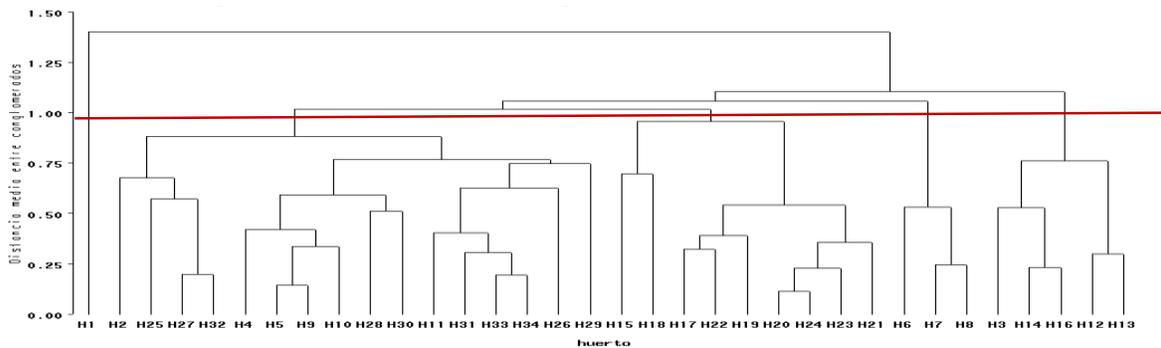


**FIGURA 17.** Mapa interpolado de positivos históricos (1999-2007) a CTV en la Península de Yucatán.

#### 4.6. Formación de grupos de riesgos al CTV

Como complemento al índice subregional se conformaron grupos de parcelas-localidad por nivel de inductividad a la tristeza. Los grupos quedaron formados de la siguiente manera: grupo a: 3,12,13,14,16 con densidad de plantación de 9X8, temperatura de 14.9 °C, baja brotación, e infestación del vector acumulada baja; grupo b: 6, 7, 8 con densidad de plantación de 9X8, temperatura 14.5 °C, brotación media e infestación del vector moderadamente alta; grupo c: 15,17,18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 con densidad de plantación de 9X7, temperatura de 14.3, brotación baja e infestación del vector media; grupo d (este grupo fue el más inductivo) correspondiente a municipios de Campeche y sur de Yucatán: 2,4, 5,

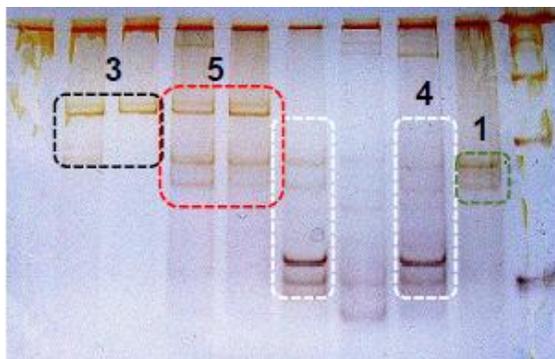
9,10,11, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 con densidad de plantación de 8X8, temperatura de 12.6, brotación alta e infestación del vector alta; grupo e: 1 con densidad de plantación de 5X5, temperatura 18 °C, brotación media e infestación del vector media. Con las cuatro variables seleccionadas densidad de plantación, temperatura, brotes tiernos e infestación del vector y con un corte del dendograma a una distancia euclidiana de 0.98 se formaron los grupos (Fig. 18).



**FIGURA 18.** Dendograma de similaridad para 34 huertos con presencia del virus del CTV considerando una distancia euclidiana de 0.98 y cuatro variables inductivas de la enfermedad.

#### 4.7. Caracterización molecular del CTV

En este trabajo se realizó el estudio molecular en un solo huerto del municipio de Ticul, Yucatán. Los resultados demostraron la existencia de tres a seis patrones electroforéticos lo cual sugiere la existencia de haplotipos. Adicionalmente, esto demuestra la existencia de un nivel bajo de heterogeneidad de la población viral (Fig. 19). Considerando que TC tiene 10 años en la región y que estos haplotipos correspondieron a aislados de tipo moderado (Loeza, 2005 y Loeza, 2005) esta heterogeneidad sugiere que este vector no ha contribuido a un incremento en la complejidad poblacional del virus y en aparición de aislados severos.



**Figura 19.** Patrones electroforéticos de árboles positivos a CTV mediante la técnica de SSCP. Una combinación de dos bandas dentro de cada corrida representa un haplotipo. Cada corrida representa un árbol positivo. Huerto Cabache 2, Municipio de Ticul, Yucatán.

## V. CONCLUSIONES

El porcentaje de incidencia a nivel peninsular del CTV después de 11 años de introducción de TC fue muy reducido (0.00005%) con relación a la población de cítricos de la superficie total productiva. No se encontraron síntomas de picado de tallo y declinamiento, lo que indica la ausencia de razas severas. Los estudios en 2010 y 2011 corroboraron bajas tasas de dispersión a nivel parcela (0.6-36%), siendo Quintana Roo el de menor incidencia (2.5%). Los parámetros epidémicos fueron mayores en Yucatán ( $1/b=0.017-0.030$ ,  $p=0.05$ ;  $ABCPE=39.6-52$ ;  $Yf=27-36\%$ ). TC y *A. spiraecola* fueron los vectores predominantes en brotes (14929 y 840, respectivamente) y trampas amarillas (49 y 713). Sin embargo, la prevalencia de estas especies, en particular TC, no se reflejó en altas tasas epidémicas y fuertes agregados ( $Morisita=0.89-0.99$  y  $Lloyd=0.88-0.99$ ). La tipología productiva regional caracterizada por huertos de bajo a mediano vigor y excesivo estrés hídrico podría ser la causa de hospedantes poco aptos para la infección y multiplicación del patógeno a pesar de la predominancia del patrón agrario, aunque no se descartan otros factores climáticos y la acción supresiva de agentes biológicos. Por otra parte, se desarrolló un método de regionalización por nivel de riesgo al CTV con base a variables de inductividad epidémica. Este método incorpora el cálculo de índices y variables asociadas al sistema epidemiológico. Se propone un Índice Subregional, el cual incluye variables de manejo agronómico y un Índice Peninsular, el cual incluye variables de hospedero, clima y vector. La validación de estos índices fue confirmada con la comparación del mapa interpolado de positivos históricos de CTV. En particular, el índice Peninsular mostró una mayor aproximación al mapa interpolado con base en positivos históricos. El manejo del CTV requiere una redefinición del marco normativo con énfasis en vigilancia epidemiológica para la prevención de riesgo.

## VI. LITERATURA CITADA

- Abbas, A. K., A. H. Litchman, and S.J. Pober. 1991. Cellular and molecular immunology. W. B. Saunders. Philadelphia. U.S.A. 417 p.
- Ayllón, M. A., C. López, J. Navas-Castillo, M.S. Garnsey, J. Guerri, R. Flores and P. Moreno. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of the citrus tristeza virus (CTV) RNA: incidence of the three sequence types in isolates of different origin and pathogenecity. Archives of Virology 146: 27-40.
- Ayllón, M. A., López, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W. O. Guerri, J. Flores, R. and Moreno P. 1999. New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. Journal of General Virology 80:817-821.
- Alamo, R. S., Cañas, M. J. A. y Feito, H. F. R. 2003. Aplicación de un S.I.G. para ampliar la agricultura de precisión en una explotación de olivar. Comunicación aceptada por la IX conferencia Iberoamericana de SIG, VII Congreso Nacional de la AESIG y II Reunion del GMCSIGT. Cáceres, 24-26 septiembre.
- Alonso, G.O., Nieto, A.D., Gutiérrez, A.J.G., Delgadillo, S.F. y Domínguez, A.J.L. 2002. Características morfológicas, culturales y patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum spp.* obtenidos de frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.). Rev. Mex. Fitopatol. 1:24-30 .
- Alonso Sarría, F. (2000). *Introducción a los Sistemas de Información Geográfica*. Disponible en: <http://www.um.es/~geograf/sig/SIGgf2000/temario.pdf>
- Ballester-Olmos J. F., A.J. Pina, A. E. Carbonell, P. Moreno, A. Hermoso de Mendoza, M. Cambra and L. Navarro. 1993. Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. Plant Pathology 42: 219-229.
- Bar-Joseph, M., and R. F. Lee. 1990. Citrus tristeza virus, revised description. CMI/AAB description of plant viruses, no. 353. Association of Applied Biologists, Warwick United Kingdom.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R. and Lee, R. F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review of Phytopathology 27:291-316.

- Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, and D. Gonsalves. 1979. The closteroviruses: a distinct group of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 25:93–168. 5.
- Candresse, T., and G. P. Martelli. 1995.
- Ben-ze'ev I. S., M. Bar-Joseph, Y. Nitzan and R. Marcus. 1989. A severe citrus tristeza virus isolate causing collapse of trees of sour orange before virus is detectable throughout the canopy. *Annals of Applied Biology.* 114: 293-300.
- Broadbent, P., H. R. Brlansky and J. Indsto. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80: 329-333.
- Bosque Sendra Joaquín (1997): "Sistemas de Información Geográfica"; Ed. Rialp. 2ª ed. Madrid. CHORLEYR., et al. (1987), Handling Geographic Information. Report of rhe Committee of Enquiry chaired by Lord Chorley, Londres, Her Majesty's Stationery Office.
- Cambra, M.; Gorris, M. T.; Marroquín, C.; Román, M. P.; Olmos, A.; Martínez, M. C.; Hermoso de Mendoza, A.; López, A.; Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- Cambra M., F.J. Ballester, A. J. Pina and A. Lavina. 1988. Translocation of citrus tristeza virus in different hosts and their combination. *Comunicaciones del tercer congreso nacional de fitopatología.* Puerto de la cruz Tenerife-Islands Canarias. 29 de octubre. Tenerife, España. p. 267.
- Cartia, G.; Barbagallo, S.; Catara, A. 1980. Lack of spread of citrus tristeza virus by aphids in Sicily. *In: Proc. 8<sup>th</sup> Conference Intern. Organ. Citrus Virologist.* Calavan, E. C., Garneys, S. M., and Timmer, L. W. (ed). Riverside, California. pp: 88-90.
- Cortez-Madrugal, H., Alatorre-Rosas, R., Mora-Aguilera, G., Bravo-Mojica, H., Ortiz-García, C.F. and Aceves-Navarro, L.A. 2003. Characterization of multisporic isolates of *Lecanicillium* (=Verticillium) *lecanii* for the management of *Toxoptera aurantii* in cocoa. *BioControl* 48: 321-334.
- Dobesberger, E .J. and McDonald, K.B. 1992. An application of geographic information system and discriminant analysis to forecast the potential

occurrence of pest infestation: an example using blue berry maggot (Diptera: Tephritidae). Pp. 233-246 in: Proc. of Symposium of Agrometeorology and Plant Protection, NAPPO-ONU, Asunción, Paraguay 368 p.

- Domínguez-Monge, S., Mora-Aguilera, G., Loeza-Kuk, E., Rivas-Valencia, P., Ruiz-García, N., Díaz-Padilla, G., Acevedo-Sanchez, G., Munguía-Rosales, R, Velázquez-Toledo, J., Escalante-Marquez, F. y Robles-Gómez, P. 2010. Regionalización Epidemiológica de la Tristeza de los Cítricos en la Península de Yucatán. V Reunión Agrícola. Campeche, México. (Abstrac)
- d'Urso F., M.A. Ayllón, L. Rubio, A. Sambade, A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri and P. Moreno. 2000. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* 49: 288-294.
- Dolja, V. V., A.V. Karasev and E.V. Koonin. 1994. Molecular evolution and evolution closteroviruses: sophisticated build-up of later RNA genomes. *Annual Review of Phytopathology*. 32: 261-285.
- Ebrahimi, Y.; Anvari, F.; Darjani, R.; Shakhollaslami, K. 1988. Nontransmission of tristeza virus by aphids in Northern Iran during the last eighteen years. pp: 65-67. *In: Proc. 9<sup>th</sup> Conference Intern. Organ. Citrus Virologist*. Timmer, L. W., Garneys, S. M., and Navarro. L. (ed). Riverside, California.
- EPPO. 1996. Distribution Maps of Quarantine Pest of Europe. Citrus tristeza closterovirus.  
[http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus\\_tristeza/CTV000\\_map.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_tristeza/CTV000_map.htm)
- Febres, V. J., L. Asholuin., M. Mawassi., M. Bar-Joseph., K.L. Manjunath., R.F. Lee and C.L. Niblett. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.
- Gafni, R., Mogilner, N., Nitzan, Y., Ben-Shalom, J. and Bar-Joseph, M. 1995. The movement and distribution of citrus tristeza and citrus exocortis viroid in citrus seedlings. *Annals of Applied Biology* 126:465-470.
- Garnsey, S. M.; Gottwald, T. R.; Borbón, J. 2000. Increase and patterns of spread of *Citrus tristeza virus* infection in Costa Rica, and the Dominican Republic

- in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology*. 88:621-636.
- Grant, T. J. and Higgins, R. P. 1956. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology* 47:272-276.
- Genus Closterovirus, p. 461–464. In F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers (ed.), *Virus taxonomy*. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Greig, S. P. 1952. The use of random and contiguous quadrats in the study of the structures of plant communities. *Ann. Bot.* 16:293-316.
- Gottwald, T. R., Sun, X., Riley, T., Graham, J. H., Ferrandino, F. and Taylor, E. L. 2002. Geo-referenced spatiotemporal analysis of urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology* 92: 361-377.
- Gottwald, T. R.; Richie, S. M.; Campbell, C. L.; 1992. LCOR2- Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Dis.* 76:213-215.
- 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.
- Hau, B. and Kranz, J. 1990. Mathematics and statistics for analysis in epidemiology. Pp 12-52 in: *Epidemics of Plant Disease. Mathematical Analysis and Modeling* (Kranz, J. ed.) 2nd Edic. Springer-Verlag. Germany. 268 p.
- Halbert, S.; Genc, H.; Cevik, B.; Brown L. E.; Rosales, M.; Manjunath K. L.; Pomerinke, M.; Tsai, J.; Dekkers, M.; Lee, R. L. F.; Niblett, C. L. 2003. Spread of citrus tristeza virus in South Florida following the establishment of *Toxoptera citricida*. p. 225 .In: *Resúmenes de la Conferencia Panamericana de Fitopatología*. Abril 5-10. South Padre Island. USA.
- Hijmans, R. J., For bes, G. A. and Walker, T. S. 2000. Estimating the global severity of potato blight with GIS-linked disease forecast models. *Plant Pathology* 49: 697-705.

- Jaime -García, R., Orum, T. V., Felix-Gastelum, R., Trinidad-Correa, R., VanEtten, H. D., and Nelson, M. R. 2001. Spatial analysis of *Phytophthora infestans* genotypes and late blight severity on tomato and potato in the Del Fuerte Valley using geostatistics and geographic information systems. *Phytopathology* 91:1156-1165.
- Karasev A.V., V.P. Boyko, S. Gowda, O.V. Nikolaeva, M.E. Hilf, E.V. Koonin, C.L. Nibblet, K. Cline, D.J. Gumpf, R.F. Lee, S.M. Garnsey, D.J. Lewandowsky and W.O. Dawson. 1995. Complete sequence of the Citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Karasev, A. V. 2000. Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annual Review of Phytopathology*. 38:293-324.
- Lee, R. F., Calvert, L. A., Nagel, J. and Hubbard, J. D. 1988. Citrus tristeza virus: Characterization coat proteins. *Phytopathology* 78:1221-1226.
- 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.
- Lloyd, M. 1967. Mean crowding. *J. Anim. Ecol.* 36:1-30.
- Loeza, K. E.; Palacios, T. E. C.; Ochoa, M. D. L.; Mora, A. G.; Gutierrez, E. M. A.; Febres, V. J.; Moore, G. A. and Alvarez, R. R. 2005. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *In*: Hilf, M. E.; Duran, A. N. and Rocha, P. M. (eds). *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. California, USA. 407-411p.
- Madden , L.V., and Pennypacker, S.P. 1979. Principal components analysis of tomato early blight epidemics. *J. Phytopathology*. 95: 364-369.
- Marble, D. 1984. Definition of geographic information system. Dept. of Geography and Computer Science. Pp.18-24 in: *Proc. of Spatial Information Technologies for Remote Sensing Today and Tomorrow*. October 24. Sioux Falls, SD.

- Mardia, K.V., Kent, J.T., and Bibby, J.M. 1979. *Multivariate Analysis*. London: Academic Press.
- Martelli, G. P., A. A. Agranovsky, M. Bar-Joseph, D. Boscia, T. Candresse, R. H. A. Coutts, V. V. Dolja, B. W. Falk, D. Gonsalves, W. Jelkmann, A. V. Karasev, A. Minafra, S. Namba, H. J. Vetten, G. C. Wisler, and N. Yoshikawa, 2002. The family closteroviridae revised. *Archives of Virology* 147: 2039-2044.
- Matthews, R. E. F. 1991. *Plant virology*. Third edition. Academic Press. USA. 835 p.
- Moreno P., J. Guerri, J.F. Ballester-Olmos, R. Albiach-Martí and M.E. Martínez. 1993. Separation and interference of strains from citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42: 35-41.
- Mora-Aguilera, G. and Campbell, C. L. 1997. Multivariate techniques for selection of epidemiological variables. Pp 51-58 in: *Exercises in Plant Disease Epidemiology*. (Francl, L. J. and Neher, D. A. eds.) APS Press . St. Paul Minnesota, USA. 233 p.
- Mora-Aguilera, G., Kiltie, R., Nieto-Angel, D., and Téliz, D. 1993. Outliers and redundant variables in principal components and factor analysis. Pages 185-194 in: *Proc. Annu. Reg. Conf. 1<sup>st</sup>*. SAS Institute, Cary, NC.
- Mora-Aguilera, G., Nieto-Angel, D., Campbell, L.C. Téliz, D., and García, E. 1996. Multivariate comparison of papaya ringspot epidemics. *Phytopathology* 86:70-78.
- 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. Cd. Victoria, Tamaulipas. México.
- Morisita, M. 1959. Measuring the dispersion of individual and analysis of distributional patterns. *Mem. Fac Sci. Kyushu Uni. Ser. E. (Biol.)*. 2:215-235.

- Narváez, G., Slimane, S. B., Ayllón, M. A., Rubio, L., Guerri, J. and Moreno, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza virus by hybridisation with digoxigenin- labelled. *Journal of Virological Methods* 85:83-92.
- 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.
- Permar, T. A., Garnsey, S. M., Gumpf, D. J. and Lee, R. F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.
- Polek, M. 2000. Permanent monitoring of citrus tristeza virus and suppression of the disease by tree removal: The case of California. *Horticultura Mexicana* 8: 19-24.
- Polek, M. 1995. The CTV eradication program in the Central Valley of California. Pp 65-71 in: *Proc. of the Third International Workshop on CTV and BrCA in The Caribbean Basin: Management Strategies*. May 15-18. Lake Alfred Fl. 269 p.
- Powell, C. A., Pelosi R. R., and 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.
- Racah, B.; Roistacher, C. N.; Barbagallo, S. 1989. Semipersistent transmission of viruses by vectors with special emphasis on citrus tristeza virus. *Adv. Dis. Vector Res.* 6:301-340.
- Raykov, T. and Marcoulides, G. A. 2008. *An introduction to applied multivariate analysis*. Taylor & Francis Group. 485 p.
- Ribeiro do Vale, F. X.; Waldir-Junior, C.J.; Zambolim, L. 2004. *Epidemiologia aplicada ao manejo de doenças de plantas*.

- Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G. Ochoa-Martínez, D., Gutiérrez-Espinosa A., Cintra de Jesús Junior, W., Malvas C., y 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.
- Rivas-Valencia, P.; Loeza-Kuk, E.; Mora-Aguilera, G.; Ruiz-García, N.; Ochoa-Martínez, D.; Gutiérrez-Espinosa, 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.
- Romesburg, H.C. 1990. Cluster Analysis for Researchers. Robert E. Krieger Publishing Com. Inc. Malabar, Florida. 339 p.
- Rocha-Peña, M.A.; Lee, R.F.; Lastra, R.; Niblet, C.L.; Ochoa-Corona, F.M.; Garnsey, S.M. and R.K. Yokomi. 1995. Citrus Tristeza virus and its vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- Ruiz-García, N.; Mora.-Aguilera, G.; Rivas-Valencia, P.; Ochoa-Martínez, D.; Góngora-Canúl, C.; Ramírez-Valverde, G.; Álvarez-Ramos, R. 2009. Sensibilidad de Inmunoimpresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico y muestreo del virus de la tristeza de los cítricos en huertos comerciales de Tamaulipas, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15 (1): 41-47, 2009.
- Ruiz, G. N. 2008. Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 105 p.
- Sambade, A. Rubio, L., Garnsey, S. M., Costa, N., Müller, G. W., Peyrou, M., Guerri, J. and 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., G. Siddarama., M.A. Ayllón., M.R. Albiach-Martí., S. Rabindram S. and W.O. Dawson. 2002. The p23 protein of citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76: 473-483.
- Sharma, S. 1996. *Applied Multivariate Techniques*. John Wiley & Sons Inc. 493 p.
- Soria, R. J., Ortiz, S. C., Islas, G. F. y Volke, H. V. 1998. *Censores remotos, principios y aplicaciones en la evaluación de los recursos naturales. Experiencias en México*. CONACYT Col. Post. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C. Publicación Especial. 93 p.
- Villareal, G. L. 2001. Antecedentes y situación del virus tristeza de los cítricos en México. *In: Memoria del Simposium Internacional Virus Tristeza de los cítricos*. Cd. Victoria Tams. 26 de febrero al 01 de marzo del 2001.
- Wallace, J. M. and Drake, R. J. 1961. Seedling yellows in California. *In: Proc. 2nd Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Price, W. C. (ed.) Gainesville, Florida. pp:141-149.
- Weber, H. J. 1943. The tristeza disease of sour-orange rootstock. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science* 43: 160-168.
- Wu, B. M., and Subbarao, K. V. 2006. Analyses of lettuce drop incidence and population structure of *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Phytopathology* 96:1322-1329.
- Wu, B. M., van Bruggen, A. H. C., Subbarao, K. V., and Pennings, G.G.H. 2001. Spatial analysis of lettuce downy mildew using geostatistics and geographic information systems. *Phytopathology* 91:134-142.
- Yokomi, R. K.; Lastra, R.; Stoetzel, M. B.; Damgsteet, V. D.; Lee, R. F.; Garnsey, S. M.; Rocha-Peña, M. A.; Niblett, C. L. 1994. Establishment of the Brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin, and its transmission of citrus tristeza virus. *Journal Econ. Entomol.* 87, 1078-1085.

## VII. ANEXOS

### Anexo 1

**CUADRO 1.1.** Criterios y Factores de estratificación (Factor) para seleccionar el número de unidades regionales (parcelas) por municipio citrícola para integrar el tamaño total de muestra para las tres entidades federativas de la Península de Yucatán.

Estado	<sup>a</sup> Municipios citrícolas	Superficie (ha)	<sup>b</sup> Factor 1	No. Positivos/mpio	<sup>c</sup> Factor 2	<sup>d</sup> Factor 3	<sup>e</sup> Factor total de ponderación (F1XF2XF3)	<sup>f</sup> No. Muestras (N=50)
<b>Q. ROO</b>	L. Cárdenas	76.00	3	5	2	3	18	0.3
	O.P.B	1,652.00	4	32	9	4	144	2.7
	F.C.P	19.00	2	3	1	3	6	0.1
	Solidaridad	7.00	1	0	1	1	1	0.0
	J.M.M	1,740.00	4	2	1	2	8	0.2
<b>CAMPECHE</b>	Calkiní	170.00	3	64	12	4	144	2.7
	Calakmul	47.00	2	0	1	1	2	0.0
	Campeche	2,176.00	4	710	16	4	256	4.9
	Candelaria	100.00	3	0	1	1	3	0.1
	Cd. Carmen	205.00	3	0	1	1	3	0.1
	Hopelchen	460.00	4	168	12	4	192	3.7
	Tenabo	364.50	4	45	9	4	144	2.7
	Champotón	722.50	4	94	16	4	256	4.9
	Escarcega	408.00	4	16	6	3	72	1.4
	Palizada	20.00	2	0	1	1	2	0.0
	Hecelchakán	117.50	3	3	1	2	6	0.1
<b>YUCATAN</b>	Abda	69.00	3	0	1	1	3	0.1
	Acanceh	35.00	2	0	1	1	2	0.0
	Akil	2,045.00	4	5	4	3	48	0.9
	Bakaba	4.00	1	0	1	1	1	0.0
	Buctotz	29.00	2	0	1	1	2	0.0
	Calotmul	25.00	2	0	1	1	2	0.0
	Cansahcab	20.00	2	0	1	1	2	0.0
	Cantamayec	18.00	2	0	1	1	2	0.0
	Celestun	2.00	1	0	1	1	1	0.0
	Cenotillo	39.00	2	0	1	1	2	0.0

Chacsinkin	9.00	1	0	1	1	1	0.0
Chapab	205.00	3	0	1	1	3	0.1
Chemax	64.00	3	0	1	1	3	0.1
Chichimila	13.00	1	0	1	1	1	0.0
Chixulum	5.00	1	0	1	1	1	0.0
Chochola	229.00	3	0	1	1	3	0.1
Chumayel	74.00	3	0	1	1	3	0.1
Cankal	17.00	2	0	1	1	2	0.0
Cancunul	15.00	2	0	1	1	2	0.0
Cuzama	3.00	1	0	1	1	1	0.0
Dzan	1,498.00	4	686	16	4	256	4.9
Dzidzantun	60.00	3	0	1	1	3	0.1
Dzilam	12.00	1	0	1	1	1	0.0
Dzitas	43.00	2	0	1	1	2	0.0
Dzoncahuic h	10.00	1	0	1	1	1	0.0
Espita	134.00	3	0	1	1	3	0.1
Halacho	155.00	3	0	1	1	3	0.1
Hocaba	44.00	2	0	1	1	2	0.0
Hoctum	1.00	1	0	1	1	1	0.0
huhi	10.00	1	0	1	1	1	0.0
Izamal	54.00	3	0	1	1	3	0.1
Kanasin	12.00	1	0	1	1	1	0.0
Kantunil	17.00	2	0	1	1	2	0.0
Kopoma	35.00	2	0	1	1	2	0.0
Mani	829.00	4	3	1	4	16	0.3
Muna	640.50	4	38	9	4	144	2.7
Maxcanu	51.00	3	0	1	1	3	0.1
Mayapan	41.00	2	0	1	1	2	0.0
Merida	85.00	3	0	1	1	3	0.1
Mococho	7.00	1	0	1	1	1	0.0
Muxipip	3.00	1	0	1	1	1	0.0
Opichen	8.00	1	0	1	1	1	0.0
Peto	1,948.00	4	0	1	1	4	0.1
Rio lagartos	11.00	1	0	1	1	1	0.0
Sacalum	773.00	4	6	4	2	32	0.6
S-ahcat	2.00	1	0	1	1	1	0.0
Samahil	632.00	4	162	16	4	256	4.9
San felipe	10.00	1	0	1	1	1	0.0
Seye	273.00	3	0	1	1	3	0.1
Sinanche	401.00	4	0	1	1	4	0.1

	Sta elena	24.00	2	0	1	1	2	0.0
	Sucila	119.00	3	0	1	1	3	0.1
	Sudzal	12.00	1	0	1	1	1	0.0
	Suma	2.00	1	0	1	1	1	0.0
	Tadziu	10.00	1	0	1	1	1	0.0
	Teabo	31.00	2	0	1	1	2	0.0
	Tekit	18.00	2	0	1	1	2	0.0
	Ticul	1,559.00	4	444	16	4	256	4.9
	Oxkutzcab	3,517.00	4	6	4	3	48	0.9
	Tekax	1,299.00	4	5	4	3	48	0.9
	Hunucmá	423.50	4	3	1	3	12	0.2
	Kinchil	251.50	3	424	16	4	192	3.7
	Umán	280.00	4	4	2	4	32	0.6
	Telchac Pueblo	47.00	2	1	1	2	4	0.1
	Motul	165.50	3	1	1	2	6	0.1
<b>Total</b>	<b>81</b>	<b>26,762.50</b>		<b>2930</b>			<b>2706</b>	<b>50</b>

<sup>a</sup> Corresponde a los municipios citrícolas en función a las hectáreas sembradas

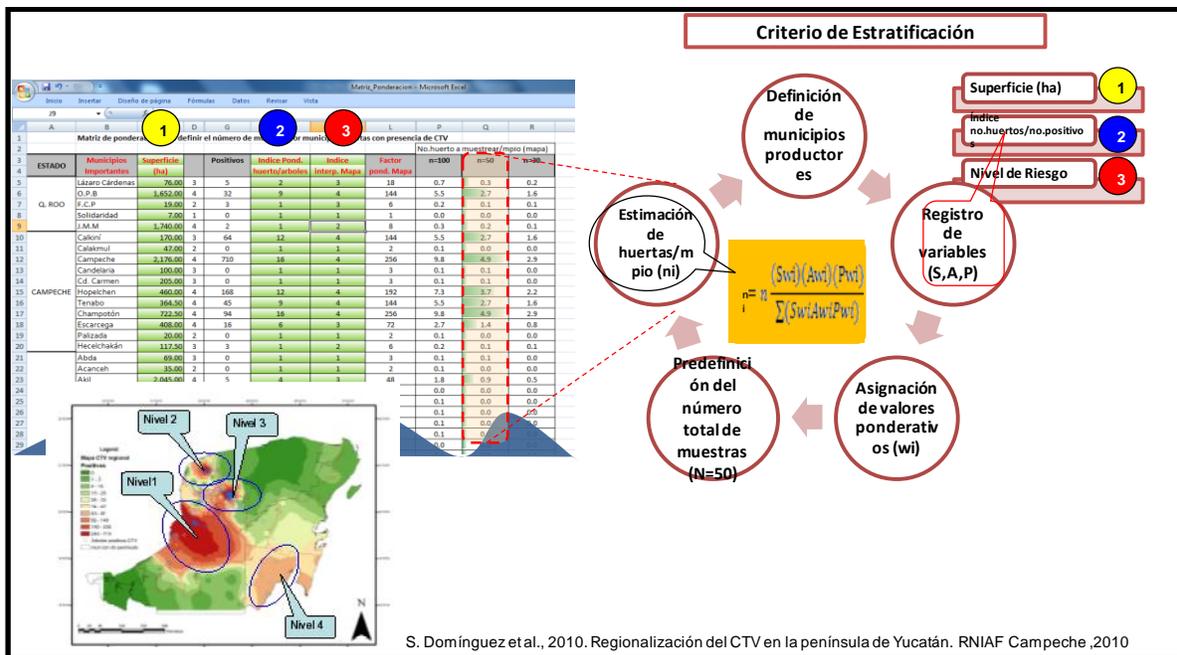
<sup>b</sup> El valor de ponderación del factor 1 corresponde a la variable de superficie en función a las hectáreas sembradas con cítricos; 1<=13, 2<=47, 3<=273 y 4<=3517.

<sup>c</sup> Valor de ponderación del factor 2 que corresponde a la variable de número de positivos por municipio: 1<=3, 2<=6, 3<=94 y 4<=710.

<sup>d</sup> Corresponde al valor de ponderación de los niveles de riesgo de la enfermedad con base a un mapa de interpolación geoestadística; 1<intensidad, 4>intensidad.

<sup>e</sup> Es la multiplicación de los tres factores considerados.

<sup>f</sup> Corresponde al tamaño de muestra: Es el factor total de ponderación de cada municipio dividido entre la sumatoria de los factores totales de todos los municipios y multiplicado por el tamaño de la muestra (N).



**FIGURA 1.1.** Esquemización de la selección de unidades regionales de vigilancia por criterios de ponderación.