

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS
MEXICANOS DEL CITRUS TRISTEZA
CLOSTEROVIRUS MEDIANTE POLIMORFISMOS
CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA



T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN
PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:
JORGE AGUILAR RIOS



Chapingo, México, marzo de 2004

DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL CITRUS
TRISTEZA CLOSTEROVIRUS MEDIANTE POLIMORFISMOS
CONFORMACIONALES DE CADENA SENCILLA**

Tesis realizada por **JORGE AGUILAR RIOS** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

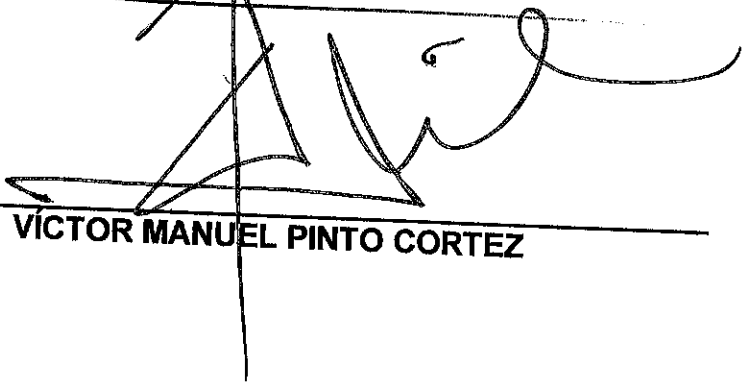
DIRECTOR:


ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:


NAHUM MARBÁN MENDOZA

ASESOR:


VÍCTOR MANUEL PINTO CORTEZ

DEDICATORIAS

Con cariño, respeto y admiración a mis
padres:

Jorge Aguilar Garcés
Inocenta Rios Alvarado

Quienes con su ejemplo y tenaz lucha
por brindarme siempre lo mejor, me
enseñan y motivan a escalar nuevos
peldaños que me llevarán a una
realización cada vez mayor

¡Mil Gracias!

A mis hermanos
Juana, Miguel Angel y Carlos

Les dedico este trabajo por los
momentos que se nos han ido de las
manos

¡Gracias por todo el cariño y confianza!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo a través del Departamento de Parasitología Agrícola por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Postgrado.

A los profesores de Postgrado por haber brindado y compartirme sus conocimientos que serán útiles en mi vida profesional.

A la Dirección de Sanidad Vegetal, en especial al Centro Nacional de Referencia Fitosanitario por el apoyo en tiempo y en el uso de las instalaciones para la realización del presente trabajo de maestría.

Al la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma, por la dirección, asesoramiento y revisión del presente trabajo.

A los Doctores Nahum Marbán Mendoza y Víctor Manuel Pinto Cortés, por la disposición y apoyo en todo momento.

Al M.C Camilo Hernández Juárez por brindarme siempre su apoyo incondicional, confianza, consejos a todo momento, pero sobre todo por su amistad.

A mis compañeros de Generación, por hacer que mi estancia fuera agradable.

A todas aquellas personas que de alguna u otra forma contribuyeron a la finalización del presente trabajo.

CONTENIDO

	Pág.
Índice de Cuadros.....	i
Índice de Figuras.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Hipótesis.....	3
1.2 Objetivos.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	
2.1 Importancia Económica de los Cítricos en México.....	4
2.2 Principales plagas de los cítricos en México.....	4
2.3 Patosistema Tristeza de los Cítricos.....	5
2.3.1 El hospedante.....	6
2.3.1.1 Ventajas que confiere el uso de patrones	7
2.3.2 Características del Virus.....	10
2.3.2.1 Razas del CTV.....	11
2.3.2.2 Caracterización biológica del CTV.....	11
2.3.3 Agentes diseminadores.....	13
2.4 Situación Mundial del CTV.....	14
2.5 Antecedentes de detecciones del CTV en México.....	15
2.6 Epidemiología.....	18

2.7 Técnicas de detección del CTV.....	23
2.7.1 Microscopía electrónica.....	23
2.7.2 Indexado o plantas diferenciales.....	24
2.7.3 Métodos serológicos	27
2.7.4. Métodos basados en la detección de ácidos nucleicos ...	28
2.7.4.1 Hibridación de ácidos nucleicos	29
2.7.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	29
2.8 Caracterización de variantes del CTV.....	31

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de muestras.....	34
3.2 Aislamientos.....	34
3.3 Caracterización de variantes	36
3.3.1 Plantas indicadoras.....	36
3.4 Extracción del RNA total.....	36
3.4.1 Determinación de la concentración de RNA total.....	38
3.4.2 Determinación de la calidad del RNA total.....	38
3.4.3 Determinación de la integridad de RNA total.....	39
3.5 Diseño y síntesis de Iniciadores (oligonucleótidos).....	39
3.6 Transcripción inversa y Reacción en cadena de la polimerasa acoplado, (RT-PCR).....	40
3.7 Análisis de los productos de la reacción.....	40
3.8 Análisis genético de las variantes de VTC por el método de polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP).....	41

IV. RESULTADOS

4.1 Biocaracterización de aislados mexicanos del CTV.....	43
---	----

4.2 Caracterización genética.....	44
4.2.1 Extracción del RNA total.....	44
4.3 RT-PCR.....	47
4.4 Análisis SSCP.....	49
4.4.1 Detección de diferencias conformacionales de aislamientos del CTV	50
V. DISCUSIÓN.....	52
VI. CONCLUSIONES.....	61
VII. LITERATURA CITADA.....	62

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Descripción	Pág.
1	Características más importantes de los patrones utilizados actualmente y su comportamiento frente a enfermedades provocadas por virus y viroides.....	6
2	Respuesta de diversas combinaciones cultivar/porta injerto a diferentes razas del virus tristeza de los cítricos.....	19
3	Aislamientos originales positivos por ELISA y propiedades biológicas (sintomatología) del CTV analizadas en este trabajo.....	35
4	Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 12%.....	42
5	Sintomatología del CTV en diferentes injertos en arboles de 7 años de edad, utilizando como patrón Lima Mexicana (<i>Citrus aurantifolia</i>).....	43
6a	Calidad y concentración de RNA total de muestra fresca, leída en el espectrofotómetro.....	45
6b	Calidad y concentración de RNA total de muestra seca, leída en el espectrofotómetro.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1	Relación de la transmisión del CTV entre <i>Toxoptera citricida</i> y <i>Aphis gossypii</i> A) Se muestra el 95% de límite de confiabilidad para cada nivel de áfido con incremento en el número de insectos por planta (Fuente Yokomi <i>et al.</i> , 1994). B) Porcentaje de transmisión de diferentes razas del CTV por ambas especies de áfidos (cortesía R.K. Yokomi).....	20
2	Curva de crecimiento tipo Gompertz que describe el crecimiento de la población en casos donde existe un límite de crecimiento de población; ejem. el número de árboles infectados por el CTV en un país. La curva es definida por la función: $N = e^A e^{-ce-kt}$ donde e es la base natural (≈ 2.71828), A y k son constantes positivas y $c = A - \ln N_0$ [donde N_0 es el valor de N (el tamaño de población) a tiempo $t = 0$]]. El tamaño máximo es e^A ; por el contrario, el crecimiento máximo ocurre en el tamaño e^{A-1} (Fuente: Lee <i>et al.</i> , 1994).....	22
3	RNA total, obtenido por dos métodos de extracción a partir de corteza del cítrico, visualizados en gel de agarosa al 0.8% y teñido con bromuro de etidio. Líneas 1 y 3) método Trizol Reagent®, tejidos secos y frescos; Líneas 2 y 4) Método de extracción rápido de RNA, en tejidos secos y frescos.....	47

- 4 Representación de los fragmentos amplificados por RT-PCR usando los priimers específicos para el gen p13 (A), gen p20 (B) y gen p23 (C) del CTV amplificando un fragmento de 500 pb, 600 pb, 800 pb y 700 pb respectivamente, de diferentes aislados de cítricos infectados con el VTC. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 GIBCO BRL; Línea 1= Jalisco; Línea 2= Chetumal; Línea 3= Campeche; Línea 4= Nayarit; Línea 5= Veracruz; Línea 6= Colima; Línea 7=Yucatan; Línea 8= Mexicali; Línea 9= Tamaulipas; y Línea 10= Michoacan; Línea 11 y 12= controles negativos..... 48
- 5 Análisis de patrones SSCP de los productos de amplificación mediante RT-PCR a partir de primers específicos para el gen p23 (panel A), p13 (panel B) y p20 (panel C) del VTC de aislamientos Mexicanos: Línea 1 Jalisco; Línea 2, Chetumal; Línea 3, Campeche; Línea 4, Nayarit; Línea 5 Veracruz; Línea 6, Colima; Línea 7, Yucatán, (electroferogruppo 1); Línea 8, Mexicali (electroferogruppo 2); Línea 9, Tamaulipas, (electrofereogruppo 3); Línea 10, Michoacán y Línea 11, Nuevo León (electroferogruppo 4). Y en p20 (panel C) Línea 10, Michoacán (electroferogruppo 4) y Línea 11 Nuevo León (electroferogruppo 5). En geles de acrilamida al 12% y teñidos con nitrato de plata..... 51

**CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL CITRUS TRISTEZA
CLOSTEROVIRUS MEDIANTE POLIMORFISMOS CONFORMACIONALES DE CADENA
SENCILLA**

**CHARACTERIZATION OF MEXICAN ISOLATES OF CITRUS TRISTEZA CLOSTEROVIRUS
THROUGH SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM ANALYSIS**

Jorge Aguilar Rios¹, Ernestina Valadez Moctezuma²

RESUMEN

El virus tristeza de los cítricos (CTV), se presenta en la naturaleza como un complejo patogénico de variantes, ocasionando diversos síntomas en varias combinaciones cultivar/injerto. Varios métodos se han utilizado para la identificación y diferenciación de variantes. Los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), son sensibles y rápidos, para la determinación de variantes vírales a nivel de DNA. Este estudio permitió detectar diferencias en los genes p13, p20 y p23 del CTV, mediante los patrones electroforéticos SSCP, de 11 aislamientos de la república mexicana; estableciendo como aislamientos suaves los detectados en las entidades de Jalisco, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Veracruz, Colima y Yucatán; como aislamientos severos a los presentes en Baja California Norte y Tamaulipas (con movilidad electroforética diferente) y como aislamientos moderado-severos a los de Michoacán y Nuevo León. La técnica fue útil al permitir la detección de forma rápida y a bajo costo de variantes severas del CTV que pudiesen ser introducidas o aparecer por mutación natural en los cítricos mexicanos, esto permite la selección oportuna de aislados suaves con capacidad protectora frente a otros severos.

Palabra clave: Citrus Tristeza Closterovirus, SSCP

1 Tesista

2 Director

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV), exists in nature as a complex mixture of strains, causing several symptoms in various cultivar/graft combinations. Several methods have been used for the identification and differentiation of strains. Single-strand conformation polymorphism analysis (SSCP), is a fast, virus-sensitive technique that detects virus strains at the DNA level. This study detected differences in the P13, P20 and P23 CTV genes in 11 Mexican isolates through SSCP analysis. Mild isolates were detected in Jalisco, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Veracruz, Colima and Yucatan states, while severe isolates were found in Baja California (Mexicali) and Tamaulipas states (with different electrophoretic mobility) and moderately severe isolates were found in Michoacán and Nuevo León states. This technique detected quickly and inexpensively the severe strains of CTV which could have entered Mexico through imported grafts or through the natural mutation of mild strains that had already been established in Mexican citrus. This detection can be useful for cross protection.

Key words: Citrus Tristeza Closterovirus, SSCP

I. INTRODUCCIÓN

El virus tristeza de los cítricos (CTV), se presenta en la naturaleza como un complejo patogénico de variantes, ocasionando diversos síntomas en distintas combinaciones de cultivar/injerto de diferentes hospederos, transmisibilidad por áfidos o la capacidad para interferir con otras variantes (Raccah *et al.*, 1980; Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Van Vuuren *et al.*, 1993).

Varios acercamientos para la identificación y diferenciación de variantes se han probado en un esfuerzo por desarrollar un procedimiento sensible, rápido, fiable y específico, que podría aplicarse para erradicar variantes severas del virus que pudiesen ser introducidas o aparecer por mutación natural en los cítricos mexicanos; y así aplicar este método para la selección rápida de aislados débiles o suaves con capacidad protectora frente a otros severos. Ello permitiría reducir los ensayos de protección cruzada, utilizando únicamente los aislados avirulentos preseleccionados en invernadero.

Los métodos utilizados para diferenciar variantes del CTV incluyen la reacción con distintos anticuerpos monoclonales, el análisis de mapas peptídicos de la proteína de la cápside, el análisis de RNAs bicatenarios (dsRNAs) en plantas infectadas y la hibridación molecular con sondas de DNA complementario (cDNA). Los dos primeros sólo detectan diferencias localizadas en el gen de la proteína capsídica, mientras que los otros dos puede detectar cambios en otras zonas del genoma. Así mismo, la hibridación molecular con sondas de cDNA obtenidas mediante retrotranscripción con cebadores al azar tiene la limitación de no dar información sobre las zonas del genoma implicadas en la diferenciación de los aislados. La secuenciación nucleotídica de genes individuales es lo más exacto para la identificación de variantes, pero a la fecha aun es costoso y el tiempo que consume para los propósitos de la rutina es alto.

Los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla o SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism), representan un método sensible y rápido para la detección de mutaciones puntuales identificadas en los productos amplificados de PCR a partir de DNA genómico (Hayashi, 1991).

Es un método rápido, simple y no isotópico (no radioactivo) que involucra la desnaturalización del DNA de doble cadena (dsDNA) por álcali o formamida para obtener DNA de una sola cadena (ssDNA) y observar su movilidad sobre un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. El PCR-SSCP es una simple y poderosa herramienta que permite por tanto, determinar las variantes a nivel de DNA de un sin número de patógenos (Orita *et al.*, 1989; Xie, *et al.*, 2002),

En el presente trabajo se utilizaron los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla como método alternativo para la detección rápida de mutaciones en el genoma del CTV de aislados mexicanos.

1.1 Hipótesis

Es posible utilizar los Polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP) para la detección rápida, precisa y sensible para la discriminación de variantes del virus tristeza de los cítricos.

1.2 Objetivos

- Implementar la técnica de SSCP para la detección de razas del virus tristeza de los cítricos (CTV) de diferentes aislamientos de la República Mexicana.
- Comparar los patrones electroforéticos de SSCP resultantes de los genes p13, p20 y p23 con las secuencias nucleotídicas reportadas para aislamientos encontrados en México.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Importancia Económica de los Cítricos en México

México tiene un total de Superficie 502,554 ha con una producción de 6'504,258 ton de cítricos, siendo el principal productor de limón mexicano y limón Persa a nivel mundial y cuarto en la producción de naranja. Con lo anterior se benefician 38,500 productores mexicanos. (INIFAP-SAGAR, 1999).

A nivel nacional la superficie cultivada de cítricos ocupa el 23% del total destinado en frutales, dicha superficie se distribuye en los estados de Veracruz, Nuevo León, San Luis Potosí y Tamaulipas que aportan el 75% de la producción Nacional, constituida por naranja, mandarina y toronja; los estados productores de limón (Colima, Michoacán, Guerrero, Veracruz y Oaxaca) aportan el 14.9%; Yucatán, Sonora, Sinaloa y Tabasco el 9.5% y otros estados el 0.6% restante. El Estado de Veracruz es el principal productor de cítricos en el país, ya que cuenta con 34% de la superficie plantada a nivel nacional (Anónimo, 1993).

2.2. Principales plagas y enfermedades de los cítricos en México

Los cítricos en México son afectados notablemente por algunas plagas y enfermedades que reducen la producción y calidad del fruto y muchas veces causan la muerte de los árboles. Las plagas más importantes que se encuentran en las regiones productoras en México son: araña roja (*Panonychus citri*, MacGregor); escamas (*Aonidiella aurantii*, Maskell; *Unaspis citri*, Comstock); trips (*Scirtothrips citri*, Moulton); pulgones (*Aphis citricola*, Van der Goot, sin. *A. Spiraecola*, Patch; *Toxoptera aurantii*, Fonscolombe; *Aphis gossypii*, Glover); minador de la hoja (*Phyllocnistis citrella*, Stainton); acaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*, Banks). Entre las

enfermedades destacan: gomosis (*Phytophthora citrophthora*, (R.E.Sm. & E.H. Sm.) Leonian; *Phytophthora parasitica*, Dast.), mancha grasienta (*Mycosphaerella citri*, Whiteside), antracnosis (*Colletotrichum acutatum* (Brown et al., 1996) antes *C. gloeosporioides*), melanosis (*Diaporthe citri*, (Fawc) Wolf); roña (*Elsinoe fawcetti*, Bitancourt y Jenkins); otras enfermedades causadas por virus y viroides, son: psorosis, exocortis, caquexia o xiloporosis (Curti, et al., 2000). Existen otras enfermedades de interés cuarentenario para México como la bacteriosis de los cítricos (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*); clorosis variegada de los cítricos-, blight (*Xyllela fastidiosa*) y la tristeza de los cítricos, como las más devastadoras a nivel mundial (Anónimo, 2001). Desafortunadamente en México se ha confirmado la presencia de la enfermedad conocida como tristeza de los cítricos desde 1983 en la mayoría de los estados productores como: Baja California (en limón persa), Colima (naranja valencia), Michoacán (naranja valencia), Nuevo León (naranja valencia), Quintana Roo (naranja valencia), Tamaulipas (naranja valencia) y Veracruz (naranja valencia). Sin embargo, desde la primera detección, la SAGARPA (entonces SAGAR) ha implementado diferentes medidas de manejo de esta enfermedad tanto a nivel legal, como de erradicación (eliminación de plantas positivas) NORMA Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos.

2.3 Patosistema Tristeza de los Cítricos

El patosistema "Tristeza de los Cítricos" esta formado por tres elementos o componentes: a) el hospedante, combinación cultivar/porta-injerto o la especie individual de cítricos, b) el virus y c) agentes diseminadores (hombre e insectos vectores). La interacción de los tres elementos con el ambiente, da origen a la presencia o ausencia de expresión de síntomas o efectos nocivos al cultivo (Rocha-Peña, 1995).

2.3.1 El hospedante.

El cultivo de los cítricos, salvo pocas excepciones, comprende plantaciones compuestas por un cultivar injertado sobre un porta-injerto (Cuadro 1), de tal forma que una planta es una combinación de dos especies distintas unidas mediante un injerto. Existen una gran diversidad de combinaciones entre el cultivar y el porta-injerto. En México, así como en las demás regiones del mundo donde la "tristeza" todavía no se ha manifestado en forma epidémica, la combinación predominante es el cultivar (naranja, toronja, etc.) sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.).

En el campo Experimental General Terán se ha generado información sobre el comportamiento de diferentes patrones tolerantes al CTV. Diversos estudios realizados desde 1966 indicaron que la naranja Valencia tardía injertada en citrange Carrizo, produce un rendimiento de fruta mayor (hasta de un 20%) y de buena calidad que cuando es injertada en naranjo agrio; las toronjas Marsh y Redblush injertadas en citrange Troyer producen también significativamente más y mejor fruto que al injertarse en naranjo agrio. (INIFAP-SAGAR, 1997).

Cuadro 1. Características más importantes de los patrones utilizados actualmente y su comportamiento frente a enfermedades provocadas por virus y viroides

Patrones	Tristeza	Exocortis	Xyloporosis
Citrango Carrizo	TOLERANTE	SENSIBLE (2)	TOLERANTE
Mandarino Cleopatra	TOLERANTE	TOLERANTE	TOLERANTE
Citrus Volkameriana	TOLERANTE	TOLERANTE	TOLERANTE
Citrus Macrophylla	SENSIBLE (1)	TOLERANTE	SENSIBLE (2)
Naranjo Amargo	SENSIBLE (1)	TOLERANTE	TOLERANTE

(1) Cuando se injertan con limoneros se muestran tolerantes.

(2) Las yemas que se utilizaron para injertar en este patrón están libres de esta enfermedad.

2.3.1.1 Ventajas que confiere el uso de patrones:

Citrango Carrizo y Troyer. El Citrango Troyer fue de los primeros patrones tolerantes utilizados en México, a parte de ser resistente a Tristeza, es vigoroso y productivo. Posteriormente se uso el Citrango Carrizo, muy similar al primero pero con algunas ventajas, considerándose más resistente a *Phytophthora*, a la asfixia radicular, a elevados porcentajes de caliza activa en el suelo y a nematodos, siendo las variedades injertadas sobre la más productiva. Como sólo representa ventajas, el Carrizo ha desplazado casi totalmente al Troyer.

Tiene buena influencia sobre la variedad injertada, con rápida entrada en producción y buena calidad de la fruta, adelantando la maduración con respecto al Naranja Amargo.

Son tolerantes a psorosis, xyloporosis, "Woody Gall" y bastante resistentes a *Phytophthora* pero sensible a *Armillaria* y a exocortis. Este último inconveniente obliga a tomar precauciones para evitar la entrada de exocortis en las nuevas plantaciones, tales como desinfectar las herramientas de poda y recolección, utilizar material vegetal certificado en caso de reinjertadas, etc.

Los patrones Troyer y Carrizo son relativamente tolerantes a la cal activa, para el caso de Troyer se ha reportado hasta un 8-9% y un 10-11% para Carrizo. Estos valores son aproximados y dependen de muchos otros factores, siendo favorable que las tierras hayan sido dedicadas anteriormente a regadío, utilización del riego por goteo, buen contenido en materia orgánica del suelo, utilización de abonos acidificantes, aportaciones periódicas de quelatos de hierro, etc. Estos patrones también son sensibles a la salinidad, no debiéndose utilizar cuando la conductividad del extracto de saturación sea superior a los 3.000 microohms/cm y la concentración de cloruros se encuentre por encima de los 350 ppm. Si la salinidad es debida fundamentalmente a sulfatos, las conductividades toleradas pueden ser superiores.

Mandarino Cleopatra. Fue el pie tolerante más empleado, actualmente sólo se utiliza en zonas con elevados contenidos de cal o problemas de salinidad. El vigor que induce sobre la variedad es menor que otros pies y aunque da fruta de mayor

calidad, el calibre y la piel es más fina; factores a tener muy en cuenta en algunas variedades. Este patrón es tolerante a todas las virosis conocidas. Bastante sensible a *Phytophthora* y a la asfixia radicular, se debe evitar plantar en suelos arcillosos. Se recomienda plantarlo siempre en alto y evitar que los emisores de riego mojen el tronco. Aunque de buenas cualidades, las plantaciones con este patrón muestran un comportamiento irregular e imprevisible, en algunos casos su desarrollo es deficiente en los primeros años.

Citrus volkameriana. En los últimos años ha tenido gran expansión debido a su gran vigor, con una rápida y buena productividad. Es muy utilizado en nuevas plantaciones, donde para aprovechar el espacio que queda vacío durante los primeros años, se plantan árboles con este patrón entre los definitivos. Principales inconvenientes: baja calidad de frutos, aunque adelanta la maduración, moderada sensibilidad a *Phytophthora* y sensibilidad media a las heladas, menos que el *Macrophylla*. Resistente a la caliza y medianamente a la salinidad. Tolerante a la Tristeza, exocortis y psoriasis, pero es sensible a xyloporosis y "Woody Gall".

Citrus macrophylla. Igual que el Amargo, patrón exclusivamente autorizado para limoneros, más vigoroso y productivo que éste, pero sobretodo se prefiere por su mayor resistencia a la salinidad. Sensible a la Tristeza y la xyloporosis, también a las heladas y a la asfixia radicular. Resistente a *Phytophthora* y a la tierra caliza. Confiere a la variedad injertada un gran vigor, precocidad en la producción y productividad. Adelanta la maduración pero disminuye la calidad de la fruta.

Naranja agrio. Patrón muy utilizado actualmente en las zonas citrícolas del Mediterráneo, California, Florida y México. Se caracteriza por ser más tolerante a la sequía que otras especies. Muestra una tasa de crecimiento baja durante los primeros años, pero ésta tiende a incrementarse con el tiempo. A pesar de que la propagación de cítricos en naranja agrio incrementa la vulnerabilidad al virus de la tristeza, este portainjerto tiene muchas ventajas: se adapta bien a la mayoría de los suelos, es tolerante a *Phytophthora*, a la gomosis de los cítricos y a la mayoría de los patógenos transmisibles por injertos y es compatible con la mayoría de los injertos:

naranja dulce, toronja, limón y mandarina. Es poco adecuado para limas y limón mexicano (Purseglove 1974; Rocha-Peña, 1995).

Limón rugoso. Tiene un sistema radical muy abundante. Produce árboles vigorosos de fructificación temprana y frutos grandes. Sin embargo, los frutos desarrollan una cáscara muy gruesa y son más ácidos y de calidad interior. Este patrón es susceptible a heladas. Se utiliza ampliamente en las zonas citrícolas de Sudáfrica, Australia y Florida. Es susceptible a la gomosis de los cítricos y a la sarna de los cítricos, pero es resistente a la tristeza. Esto último le confiere una especial importancia a este patrón. Muestra una muy buena compatibilidad con injertos de limones, limas y limón mexicano. También se utiliza para toronja y mandarina. (Purseglove 1974; Rocha-Peña, 1995).

Poncirus trifoliata. Muy resistente al frío, tristeza y *Phytophthora*, pero con problemas en suelos calizos, pobres o salinos. Da mala calidad de fruto y su manejo no es fácil.

Naranja dulce: Es menos resistente que el naranjo agrio, pero más que el limón rugoso. Es de crecimiento lento, pero produce árboles muy longevos y frutos de buena calidad. Se utiliza como patrón en California y en algunas otras regiones. Es susceptible a gomosis de los cítricos, pero resistente a la sarna de los cítricos y a la tristeza. Se utiliza como patrón para naranjas y limones. (Purseglove 1974; Rocha-Peña, 1995).

limón mexicano (*Citrus aurantifolia*): Si bien el fruto de esta especie es conocido en México como limón, el verdadero limón llamado así en el resto del mundo, pertenece a la especie *C. limon*. Al limón mexicano se le conoce fuera del país también como lima ácida, lima mexicana o lima key (Palacios, 1978), y como estos nombres lo indican, pertenece al grupo de las limas. *C. aurantifolia* es una planta originaria de los archipiélagos del Sudeste de Asia, introducida en Europa en el siglo XIII y traída a México por los españoles durante los primeros años de la Colonia. Actualmente se cultiva de manera intensiva en México, las Antillas y Egipto. *C. aurantifolia* produce un fruto muy apreciado por su jugo ácido, el cual es utilizado en

gran cantidad de productos industrializados (Purseglove, 1974). El limón mexicano es un árbol de tamaño mediano que alcanza 5 m de altura. Está armado con un gran número de espinas cortas y afiladas. Las hojas son pequeñas de 4-8 x 2-5 cm, ovaladas o elípticas. El peciolo presenta pequeñas alas. Las flores son axilares y se producen durante un período extenso. Los frutos son casi esféricos y pequeños (3.5-6 cm de diámetro). La cáscara es delgada y se adhiere fuertemente a la pulpa, su color es amarillo verdoso cuando el fruto está maduro. El fruto tiene un gran número de semillas y abundante jugo, muy aromático y ácido (7-8% de ácido cítrico). La piel contiene una buena cantidad de aceites esenciales. Esta especie tiene de un 3 a un 14% de poliembriónía (Palacios 1978). El limón mexicano se caracteriza por ser el más rústico de los cítricos ya que sobrevive en suelos pobres, sin embargo es muy susceptible a ciertos hongos como *Gloeosporium limetticolumn* (Purseglove, 1974) y a un importante número de virus, incluido el de la Tristeza de los Cítricos (Palacios, 1978).

2.3.2 Características del Virus

La Tristeza de los cítricos es una enfermedad de distribución mundial, ocasionada por un virus que pertenece al grupo de los closterovirus limitado al floema, de varilla flexible que mide 2000 x 11 nm (Bar Joseph, 1989), con genoma de RNA de cadena sencilla (ssRNA) de sentido positivo de 19.296 nucleótidos (Karasev *et al.*, 1995). Presenta dos cápsides proteicas, una de 25 kDa (Pappu *et al.*, 1993) cubriendo el 95% de la longitud de la partícula viral y otra divergente (dCP) de 27 kDa (Pappu *et al.*, 1994; Febres *et al.*, 1994), presente únicamente en la parte terminal de la partícula formando una estructura en forma de cascabel, producto del gen p27 (Febres *et al.*, 1996), del cual se postula una función en la transmisibilidad por áfidos vectores de manera semipersistente (Berlansky *et al.*, 1988). Otra posibilidad alternativa, puede ser que la parte terminal del gen p27 dirige la partícula del closterovirus al receptor celular del hospedero. Además presenta cuatro regiones nucleotídicas altamente conservadas, dominios I, II, III y IV (Febres *et al.*, 1994).

El genoma viral completo, de cuatro aislamientos ha sido secuenciado. El aislamiento T36 de Florida (Karasev, 1995; Pappu, 1994) el VT de Israel (Mawasii, 1996), el SY568 de California y el T385 de España (Vives, 1999). Estos aislamientos, se conocen como "secuencias maestras" y se piensa, que pudieran representar la mayoría de la población; puesto que los aislamientos normalmente son poblaciones complejas de diferente genoma y RNA's defectuosos.

Los genomas de estos aislamientos contienen entre 19,200 y 19,300 nt e incluyen 12 marcos de lectura abierta (ORFs), que potencialmente codifican para 17 productos proteícos y regiones no traducibles (UTR) en los fragmentos terminales 5' y 3'(Vives, 1999).

2.3.2.1 Razas del CTV

El CTV se presenta en la naturaleza como un complejo diverso de razas (variantes, cepas o aislamientos) que varían en la transmisibilidad por áfidos y patogenicidad dependiendo de la combinación cultivar/portainjerto que infectan. El tipo y severidad de los síntomas dependen de la cepa del virus, de la especie o genotipo de la planta. (Bar-Joshep1989, Garnsey 1991, Lastra *et al.*, 1992; Lee 1992)

2.3.2.2 Caracterización biológica del CTV

En términos generales, las razas del CTV que han sido caracterizadas hasta la fecha (Garnsey *et al.*, 1991, Lastra *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993) se han catalogado en cuatro grupos de acuerdo a los síntomas que ocasionan en una serie de hospedantes (Lee *et al.*, 1992 y 1993).

Razas tipo declinamiento (Decline-inducing): el declinamiento del árbol es usualmente el resultado de la necrosis del floema a la altura de la unión del injerto en plantas de naranja (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck), toronja (*C. Paradisi* Macf.), o mandarina (*C. reticulata* Blanco), injertadas ya sea en naranjo agrio o naranjo macrofila (*Citrus macrophylla* Webster). Este declinamiento está asociado con clorosis y marchitamiento de las hojas, estancamiento del crecimiento del fruto, agotamiento del almidón en el sistema radicular y la subsecuente destrucción de las raíces alimentadoras. Sin raíces el árbol se marchita presentando síntomas de declinamiento rápido. La progresión de síntomas en este tipo en árboles, desde el marchitamiento de las hojas hasta la muerte del árbol ocurre en pocas semanas.

Los árboles que declinan lentamente usualmente desarrollan lo que se conoce como "honey-combing", que son una serie de agujeros bajo la corteza justo debajo de la unión del injerto, además la corteza de los árboles infectados con portainjertos de naranjo agrio, se adelgaza (Rocha-Peña, 1995).

Raza tipo picado del tallo: Consiste en picaduras o canales longitudinales que se forman en el tallo o en las ramas si afectan el patrón. Las acanaladuras se pueden presentar, ya sea en la parte superior del árbol (copa o cultivar) o en el porta-injerto, justo debajo de la unión del injerto. En el caso de las ramas, se pueden volver quebradizas y romperse con el viento o con el peso de la fruta. La pérdida del vigor de la planta, reducción severa de la producción y frutas de tamaño pequeño e inducción de declinamiento gradual o repentino en plantas injertadas en naranjo agrio son el resultado de la infección con razas tipo picado del tallo. (Rocha-Peña, 1995).

Razas tipo amarillamiento: Presentan un amarillamiento en hojas, puede ser simultáneamente tipo declinamiento y/o tipo picado del tallo.

Razas débiles: Son aquellas que no inducen ninguno de los síntomas asociados al CTV descritos anteriormente, solo ocasionan un ligero aclaramiento de las nervaduras en plántulas de lima mexicana, la cual es el hospedante más susceptible para el CTV (Garnsey *et al.*, 1987, 1991; Lee *et al.*, 1992, 1994).

Cabe mencionar que los determinantes virales que inducen cada uno de los síntomas antes descritos (declinamiento, picado del tallo y amarillamiento), aparentemente son independientes uno del otro; sin embargo una determinada raza puede poseer uno o varios de ellos. Existe un amplio rango de expresión para cada uno de los síntomas asociados al CTV. Ejemplo, el declinamiento en plantas sobre naranjo agrio puede variar de gradual a repentino, la expresión de amarillamiento de las plántulas puede ser débil o acentuado, el picado del tallo puede presentarse ya sea en toronja, o naranja o en ambas; asimismo, la severidad de las acanaladuras puede oscilar de débil a severa. Debido a lo anterior, la "severidad" es un término relativo que involucra intrínsecamente al hospedante y a la raza del virus (Lee *et al.*, 1994).

2.3.3 Agentes diseminadores

La introducción de especies y cultivares de cítricos de un país ó de un área citrícola a otra es una práctica común. Debido a que México no es país de origen de los cítricos, la introducción de germoplasma es una necesidad para la citricultura nacional. Sin embargo, este intercambio de material vegetativo puede conducir a la introducción de enfermedades. Históricamente la diseminación de plagas y enfermedades ha estado íntimamente ligada al movimiento de cítricos alrededor del mundo. Todas las virosis y enfermedades de los cítricos se transmiten a través del injerto y rara vez por semilla; de esta forma el hombre es el responsable principal del movimiento del CTV a través de grandes distancias y entre áreas geográficas (Lee *et al.*, 1992, 1994). Sin embargo, el problema potencial del CTV, el cual es transmitido por injerto y por yema, es diseminado por una serie de áfidos de manera

semipersistente, con una capacidad de transmitir el virus entre 24-48 horas después de su adquisición (Bar-Joshep 1989, Yokomi 1994, Raccach, *et al.*, 1989; Roistacher, *et al.*, 1981, 1987), siendo el más eficiente el pulgón café (*Toxoptera citricidus*) también llamado "áfido oriental o asiático" (Lee *et al.*, 1992; Raccach, *et al.*, 1989; Roistacher *et al.*, 1987; Yokomi *et al.*, 1994). Sin embargo, en las áreas cítricas del mundo en donde *T. citricidus* aún no está presente, *Aphis gossypii* Glover puede también transmitir en forma eficiente algunas razas del CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1992; Roistacher *et al.*, 1987), el resultado de transmitir cinco aislados exóticos del virus seleccionados, indicó una relación promedio de transmisión por áfido de 16% para *T. citricida* comparada con un 1.4 % de *A. gossypii*. Otras especies de áfidos reportados como vectores del VTC pero con grados más bajos de eficiencia de transmisión, basándose en trabajo experimental incluyen a *A. spiraecola* Patch (anteriormente descrito como *A. citricola* Van der Goot) (Yokomi *et al.*, 1987), *Toxoptera aurantii* Boyer de Fonscolombe y *A. craccivora* Koch y *Dactynotus jaca* L. (Bar-Joshep 1989, Lee 1992, Raccach 1989, Yokomi 1994, Roistacher 1987).

2.4 Situación Mundial del CTV

Esta enfermedad fue descubierta en Sudáfrica en 1910 y posteriormente apareció en Java (1928) y fue distribuyéndose mundialmente debido al movimiento de varetas y plantas de cítricos infestados. En la búsqueda de nuevas variedades de cítricos, llegó a Argentina (1931), Brasil (1937), donde ocurrieron severas epidemias en las que más de 30 millones de árboles fueron aniquilados; mientras que California e Israel (1939) sufrieron epidemias menos severas. En España y Venezuela, durante las décadas de 1960 y 1980 murieron 10.0 y 6.6 millones de árboles, respectivamente. Actualmente esta enfermedad está presente en prácticamente todas las zonas cítricas del mundo, con la excepción de algunas regiones de la cuenca del Mediterráneo y México. (Rocha-Peña, 1995).

En México, de hecho se han reportado brotes aislados de esta enfermedad en 12 entidades citrícolas; sin embargo, todavía no ha ocasionado daños a la citricultura por ocurrir en forma de infecciones asintomáticas, además de la rápida eliminación de árboles afectados. No obstante lo anterior, la presencia del VTC en territorio nacional se considera como un escenario de alto riesgo, debido principalmente a la predominancia del patrón de naranjo agrio en la mayoría de las plantaciones. (Rocha-Peña, 1992)

2.5 Antecedentes de detecciones del CTV en México

En 1983 se detectó por primera vez la presencia del virus causante de la tristeza de los cítricos en el Estado de Tamaulipas, México. Un posterior brote de CTV se reportó en 1986 en el Estado de Veracruz; ambos brotes detectados fueron lotes experimentales, los cuales con fundamento en la Ley de Sanidad Fitopecuaria de los Estados Unidos Mexicanos y su Reglamento en Materia de Sanidad Vegetal, fueron erradicados en su oportunidad. Debido a ello, la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV) instrumentó el certificado libre de CTV como requisito previo para la movilización de material propagativo y planta de vivero dentro del territorio nacional.

El 10 de junio de 1992, la DGSV comunica a la Delegación Estatal de la SAGARPA (antes SARH) de Veracruz, la detección del CTV en el vivero "El Papayo", la cual a su vez lo hace del conocimiento de la Asociación Agrícola Local de Viveristas de los Municipios de Martínez de la Torre y Tlacotalpan, productores de cítricos, instruyéndole medidas cuarentenarias y de erradicación.

El 29 de junio se destruyen 70,000 plantas del mencionado vivero; sin embargo, dicha asociación promovió juicio de amparo ante el Juzgado Primero del Distrito Xalapa, Ver. contra la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (hoy SAGARPA), a pesar del amparo se continuó el muestreo.

Durante el mes de agosto de ese mismo año, se detectaron positivos 18 árboles de una huerta del Campo experimental del INMECAFE en Tlapacoyan, tres más en la huerta EXFIRA, así como el vivero "Procigo" en Martínez de la Torre, Ver.

Con fecha 2 de septiembre, el Juzgado da la sentencia a favor de la Secretaria, es decir el juicio de amparo promovido por los productores es invalido, aunque estos recurren al recurso de revisión. En septiembre y octubre se derribaron y destruyeron los árboles infectados de la huerta de INMECAFE y de EXFIRA. En noviembre se diagnostica positivo el vivero "El Limoncito" en Martínez de la Torre.

En total, de junio a diciembre de 1992, se habían enviado 12,078 muestras al INIFAP de General Terán, N.L. procedentes del Campo Experimental del INMECAFE, Huerta EXFIRA y 60 viveros. Se eliminaron 70,024 plantas y quedó pendiente la destrucción de la planta del vivero "El Limoncito 2". Para la atención de esta emergencia, el Gobierno Federal aportó al Comité Estatal de Sanidad Vegetal 700 mil pesos.

Para el año de 1993, en enero, se acepta el recurso de revisión interpuesto por la Asociación Agrícola de Viveristas, motivo por el cual, la DGSV en febrero, notifica a la Delegación Estatal de la SAGARPA en Veracruz la cancelación de la movilización de material vegetativo de los viveros del estado y la suspensión del muestreo hasta que se concluyera el proceso jurídico. A esa fecha se habían muestreado 207 viveros y tomado 17,618 muestras. Del análisis de las muestras, se detectó (en marzo) la presencia del CTV en 5 viveros: El Jardín, Agua Nacida, Santa Consuelo 1, del Gobierno del estado y Paso Saltillo.

A fin de contar con un marco legal que fundamentara las acciones contra el CTV, el 6 de junio de 1993 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana 001-SAR-1-1993, por la que se establece con carácter obligatorio el Plan de Emergencia contra el Virus Tristeza de los Cítricos, mediante la cual la Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural a través de la DGSV, inició la Campaña

Fitosanitaria contra el CTV con el objeto de erradicar los brotes detectados en el Estado de Veracruz, evitar la diseminación del patógeno en el país y establecer medidas preventivas en los demás estados productores de cítricos; entre ellas las acciones de cuarentena en las localidades donde se detectaron brotes de CTV con el objeto de evitar la movilización de planta y material vegetativo infectado con el virus. Para ello se establecieron 4 casetas fitosanitarias (Cerro Azul, Poza Rica, Martínez de la Torre y Tlapacoyan) en el área afectada y a través de ellas se reguló la movilización de material vegetativo hacia otras entidades citrícolas del país.

Durante 1993 (de julio a diciembre) se eliminaron 483,900 plantas de los seis viveros pendientes y de tres más (Maricruz, La Guasima 2 y San Isidro) de cinco detectados durante este período, quedando pendientes 299,000 plantas de otros dos viveros ("El Caudillo" y "Las Palmas"), las cuales fueron eliminadas en 1994.

De 1992 a 1994 se eliminaron en el Estado de Veracruz aproximadamente 807,624 plantas infectadas de 14 viveros y dos huertas.

Paralelamente a la atención de la problemática en Veracruz, la DGSV ejecutó un muestreo y diagnóstico de material vegetal en 17 entidades citrícolas del país. En la primera etapa (abril-mayo) se muestrearon: Yucatán, Tabasco, Quintana Roo, Campeche, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas, Sonora, Colima y Veracruz; y en una segunda fase (noviembre-diciembre) se muestrearon siete entidades: Jalisco, Oaxaca, Hidalgo, Guerrero, Chiapas, Michoacán y Puebla.

De este muestreo, se determinaron variantes asintomáticas de CTV en Jalisco (Atotonilco), Michoacán (Apatzingán, Chiquillo), Hidalgo (Orizatlán), Puebla (Sn. José Acatenco), Oaxaca (Santa Rosa) y Chiapas (Ocozocuatla).

En 1995 se reanudan los muestreos analizando 45,508 muestras, de donde se detectaron 14 arboles positivos. Los resultados se enviaron a la delegación de la

SAGAR girando instrucciones de destrucción (Oficio 311.01.01.02/07707 del 29 de mayo de 1996 y Oficio 311.01.01.02/12584 del 12 de septiembre de 1996).

El 13 de agosto de 1997, el INIFAP concluyen los análisis del muestreo realizado en 1996; de un total de 22,427 muestras, se detectan 427 muestras positivas al CTV.

2.6 Epidemiología

La expresión de los síntomas y la diseminación del virus depende de la interacción de todos los componentes del patosistema. Existen evidencias experimentales que indican que el CTV se presenta en la naturaleza como una combinación o mezcla de razas en un mismo hospedante (Moreno *et al.*, 1991). Por lo tanto, la expresión de síntomas en forma natural en un hospedante determinado depende de la predominancia de razas “poco patogénicas” vs “extremadamente patogénicas”, para ese hospedante (combinación cultivar/porta-injerto) en particular. Por ejemplo, en Centroamérica se han detectado razas “severas” (tipo declinamiento o tipo picado del tallo) del CTV en plantas injertadas en naranjo agrio, que no mostraban síntomas de declinamiento (Lastra *et al.*, 1991; Peña del Río *et al.*, 1987). La detección se efectuó mediante serología con el anticuerpo monoclonal MCA-13, selectivo a razas severas del CTV (Permar *et al.*, 1990).

Los árboles injertados en porta-injertos distintos al naranjo agrio y al naranjo macrofila, como mandarino Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tanaka), limón rugoso (*C. jambhiri* Lush), naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) citranges (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), citrumelos (*C. paradisi* x *P. trifoliata*) y algunos otros, normalmente no muestran ningún efecto por el virus cuando están infectados por razas tipo declinamiento; es por ello que este grupo de porta-injertos, se les conoce comúnmente como “patrones tolerantes a tristeza”.

No obstante lo anterior, existen algunas razas tipo picado del tallo que causan acanaladuras en la madera de algunos de ellos (e.g. limón rugoso, limón Volkameriano, limonero Rangpur), con acentuado efecto en el vigor y la productividad del árbol. Otro ejemplo lo constituyen las mandarinas sobre patrón trifoliado, las cuales pueden ser portadoras asintomáticas de razas extremadamente severas del tipo picado del tallo; sin embargo, retienen niveles bastante altos de concentración de virus, haciéndolas fuentes de inóculo sumamente peligrosas; particularmente para combinaciones susceptibles, como son las toronjas y naranjas sobre diversos porta-injertos. (Cuadro 2).

Cuadro 2: Respuesta de diversas combinaciones cultivar/porta injerto a diferentes razas del virus tristeza de los cítricos.

Predominancia de razas CTV	<u>Naranja, Toronja, madarina</u> Naranjo agrio	<u>Naranja, Toronja, madarina</u> Naranjo agrio	<u>Limón mexicano</u> Naranjo agrio	<u>Limón mexicano</u> Naranjo agrio
Tipo débil	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas	Ligero aclaramiento de nervaduras	Ligero aclaramiento de nervaduras
Tipo Declinamiento	Declinamiento gradual o repentino, muerte de árboles	Ausencia de síntomas	Severo aclaramiento de nervaduras, declinamiento muerte de árboles	Severo aclaramiento de nervaduras, debilitamiento de árboles, tamaño reducido de fruto
Tipo picado del Tallo	Declinamiento gradual o repentino, muerte de árboles	Picado del tallo en naranja e en el porta-injerto, debilitamiento de árboles, tamaño reducido de fruto	Severo aclaramiento de nervaduras, declinamiento muerte de árboles	Severo aclaramiento de nervaduras, debilitamiento de árboles, tamaño reducido de fruto

Existen evidencias que indican diferencias en transmisibilidad de razas del CTV por diferentes especies de áfidos (Fig. 1A y B). En estudios efectuados por Yokomi y colaboradores se demostró que la capacidad de *Toxoptera citricida* para transmitir el CTV es casi 10 veces mayor que *Aphis gossypii*.

Los resultados expresados como probabilidad de transmisión por áfidos individuales tuvieron un promedio de 16 % para *T. Citricida* comparado con 1.4% para *A.*

gossypii. Ambas especies fueron capaces de transmitir diversas razas del CTV de diferentes orígenes con alta eficiencia en la transmisión (Fig. 1A). Una raza tipo picado del tallo de Hawaii no fue transmitida por *A. gossypii*, pero en cambio si fue transmitida por *T. citricida* (Fig. 1B).

Existen evidencias (Roistacher *et al.*, 1981, 1987; Yokomi *et al.*, 1987) que algunas razas del CTV son altamente transmisibles por *A. gossypii*, mientras que otras no lo son. Por otra parte, las altas poblaciones en que *A. spiraecola* ocurre frecuentemente en la mayoría de las plantaciones de cítricos puede compensar su relativa baja eficiencia como vector del virus (Yokomi *et al.*, 1987); por lo que esta especie puede jugar un papel importante adicional en la diseminación del virus al campo (Yokomi *et al.*, 1991).

En términos generales, tanto las razas tipo declinamiento como el tipo del picado del tallo son eficientemente transmitidas por *Toxoptera citricida*; asimismo, algunas de ellas también son transmitidas en forma eficiente por *Aphis gossypii* (Fig. 1B).

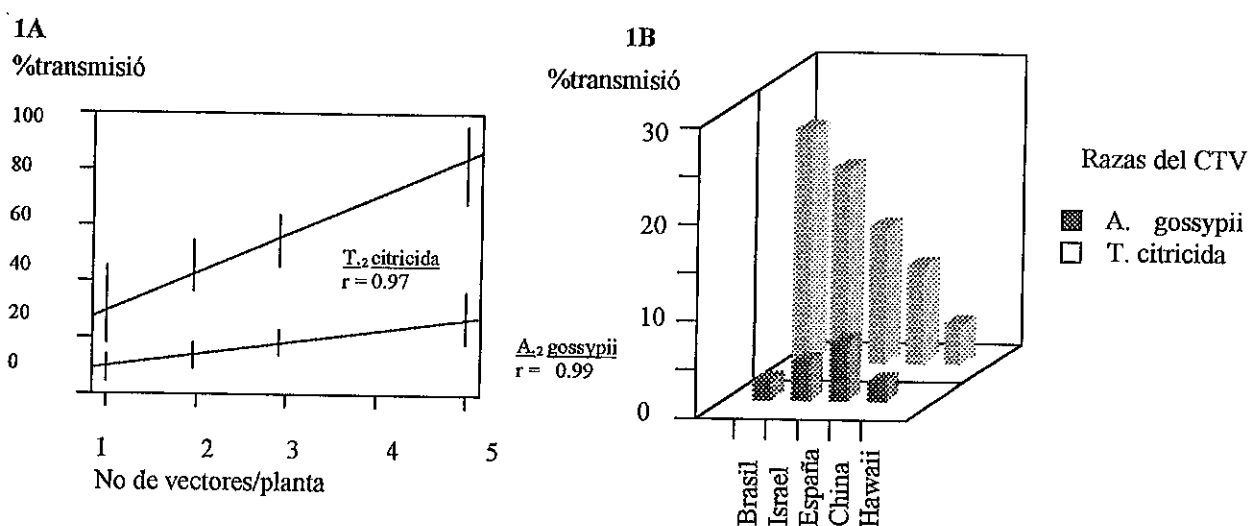


Figura 1. Relación de la transmisión del CTV entre *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii* A) Se muestra el 95% de límite de confiabilidad para cada nivel de áfido con incremento en el número de insectos por planta (Fuente Yokomi *et al.*, 1994). B) Porcentaje de transmisión de diferentes razas del CTV por ambas especies de áfidos (cortesía R.K. Yokomi).

La transmisión del CTV por áfidos es afectada por el hospedante (Bar-Joseph *et al.*, 1973; Lee *et al.*, 1994; Raccach *et al.*, 1989; Roistacher *et al.*, 1987). La naranja es más adecuada para la adquisición del virus en comparación de toronja y limones. Asimismo, se ha observado que la naranja es más susceptible a la infección mediante la inoculación por áfidos. Las temperaturas bajas de alrededor de 22°C son generalmente más favorables para la transmisión que las temperaturas arriba de los 30°C. Los cultivares de cítricos que crecen y brotan en forma vigorosa atraen áfidos en forma abundante. La práctica cultural de podas mecánicas, ya sean laterales o en la parte superior de la copa, inducen la formación constante de brotes nuevos, por lo que también se favorece la aparición de altas poblaciones de áfidos (Lee *et al.*, 1994). La expresión de los síntomas también es afectada por la temperatura; por lo general los síntomas se expresan más claramente en condiciones de temperaturas de alrededor de 22°C que arriba de los 30°C. Los síntomas de declinamiento a nivel de campo en plantas injertadas en naranjo agrio, generalmente son más acentuados cuando las plantas están sometidas en el verano a condiciones altas de temperaturas y falta de agua (Lee *et al.*, 1992, 1994).

Un aspecto de suma importancia en el combate del CTV, es el de contar con información que indique las tasas de infección del CTV en un área determinada. Sin embargo, es conveniente tener presente lo señalado en la sección anterior: la ocurrencia del CTV en ocasiones puede ser en forma asintomática, dependiendo de la predominancia de razas del virus implícitas y de la combinación cultivar/porta-injerto de que se trate. Por lo tanto, la ausencia de síntomas en una plantación, no es indicativa de la ausencia de infección por el CTV, ni de la ausencia de razas severas.

Investigadores de Estados Unidos y de España (Cambra *et al.*, 1990; Gottwald *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994; Yokomi *et al.*, 1991), realizaron estudios para determinar el avance de la enfermedad en plantaciones experimentales en Hawaii, Costa Rica, República Dominicana, España y Taiwan. Los resultados demuestran que el avance de la enfermedad se acomoda al tipo de curva Gompertz (Fig. 2). Los niveles iniciales de infección son bastante bajos; sin embargo, se incrementa súbitamente de

una forma más o menos exponencial para luego bajar ligeramente y volver a incrementarse de nuevo. La forma en que se presentó la epidemia por el CTV en Venezuela en los 80's confirma este tipo de avance epidemiológico.

Los resultados obtenidos indican que la distribución de los árboles infectados en una plantación es de una forma no agregada o al azar; lo anterior significa que es más probable que se infecten los árboles a distancia, en comparación a los que se encuentran adyacentes al foco de infección. Apparently, el vuelo de los áfidos vectores tiende a efectuarse con mayor frecuencia a árboles distantes, más que a los árboles vecinos. Estos resultados son de importancia desde el punto de vista de muestreo. Lo anterior sugiere que cuando se descubre un árbol que está infectado por el CTV, es menos probable que los árboles circundantes estén infectados en comparación con otros en la misma plantación (Gottwald *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1994).

Para medir la eficiencia de cualquiera de las medidas de combate contra el CTV, es necesario cuantificar la medida aplicada en función de la disminución de las tasas de infección, lo cual se traducirá en el retraso del incremento de la enfermedad en tiempo y espacio en la curva de Gompertz antes mencionada (Fig. 2).

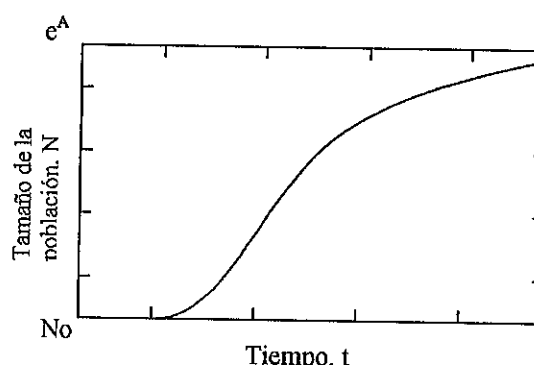


Figura 2. Curva de crecimiento tipo Gompertz que describe el crecimiento de la población en casos donde existe un límite de crecimiento de población; ejem. el número de árboles infectados por el CTV en un país. La curva es definida por la función: $N = e^A e^{-ce^{-kt}}$ donde e es la base natural ($=2.71828$), A y k son constantes positivas y $c = A - \ln N_0$ [donde N_0 es el valor de N (el tamaño de población) a tiempo $t = 0$]. El tamaño máximo es e^A ; por el contrario, el crecimiento máximo ocurre en el tamaño e^{A-1} (Fuente: Lee *et al.*, 1994).

2.7 Técnicas de detección del CTV

Para la identificación del CTV, existen varias metodologías como: reconocimiento visual en el campo, microscopía electrónica, indexado o plantas diferenciales, cuerpos de inclusión, métodos serológicos (ELISA) y moleculares (RT-PCR, hibridación molecular, RFLP).

2.7.1 Microscopía electrónica.

El microscopio electrónico funciona a base de una fuente de electrones que pueden considerarse como una radiación de pequeña longitud de onda. En la práctica permite la resolución de estructuras separadas por uno a cinco angstroms o sea 1000 veces mejor que el microscopio óptico. Los electrones no pueden moverse a gran distancia en el aire. La columna del microscopio electrónico donde se encuentran las lentes, el compartimento en donde se introduce la muestra a observar y la pantalla, debe estar al alto vacío lo cual se logra mediante bombas que extraen el aire y el vapor de agua u otros gases que puedan evaporarse de la muestra. Esto limita los tipos de muestra que puedan examinarse. La mayoría de los organismos no sobreviven al vacío y algunos materiales no resisten el calentamiento producido por la irradiación electrónica. Debido a estas causas los líquidos y sólidos con bajo punto de ebullición y fusión están excluidos. No obstante que la corriente del chorro de electrones es baja, al enfocarse en un área pequeña, la intensidad de radiación ionizante es suficientemente grande para producir cambios moleculares en la muestra. Estos cambios son químicos y afortunadamente sólo en pocos casos afectaron a la muestra (Anónimo, 1993a).

Con el fin de detectar las estructuras características del virus (filamentos flexuosos) se observa la savia de árboles afectados con síntomas de tristeza por medio del microscopio electrónico. Esta estrategia tiene el inconveniente de que es costosa, ya que requiere personal y equipo especializado; además requiere concentrar el

extracto de tejido antes de la observación y árboles con baja concentración del virus pueden no ser diagnosticados.

2.7.2 Indexado o plantas diferenciales

Al final de 1950 se describen por primera vez, inclusiones en el tejido floemático de los cítricos infectados con el CTV (Schneider 1957a; Schneider, 1957b; Schneider, 1959). Se observó que después de inocular plantas sanas, el CTV invade las células del parénquima próximo al floema, adyacentes a los tubos cribosos. La primera respuesta de las plantas indicadoras (lima mexicana o limón criollo) se manifiesta con un aumento en el grosor de la membrana citoplasmática y una tinción intensa en las células alargadas de este parénquima. Las células así afectadas fueron denominadas "células cromáticas".

El citoplasma de las células invadidas se torna más denso, mientras la vacuola reduce su tamaño dividiéndose algunas veces en varias de menor magnitud. El núcleo permanece intacto y la célula continúa viviendo por algún tiempo (Schneider, 1957a).

La aparición de cuerpos cristaloides alargados (inclusiones) permiten destacar a las células invadidas por el virus cuando se examinan cortes finos de tejido. En cítricos como las limas ácidas, que manifiestan síntomas de acanaladuras en los tallos y amarillamiento de las nervaduras, las células cromáticas se extienden hacia el tejido meristemático vecino. En el tejido primario es posible observar áreas localizadas del meristema fundamental, fibras del procambium, protoxilema y protofloema afectados. En el tejido secundario del árbol, el cambium vascular es invadido, y algunas células cambiales y sus derivadas inmediatas se colorean y otras se hipertrofian, formándose una masa de células hipertrofiadas del parénquima con células cromáticas ocasionales en el lugar donde deberían formarse el xilema y el floema. En

consecuencia, cuando se despega la corteza y el tejido anormal se desprende, se observa una depresión que constituye la acanaladura (Schneider, 1957b).

Por otra parte, el aclaramiento de las nervaduras se produce en una fase inicial del desarrollo de las mismas, donde algunas células del parénquima próximas al protofloema se vuelven cromáticas y otras hipertrofiadas, diferenciándose masas de células del parénquima muy vacuoladas que tienen apariencia translúcida (Schneider, 1957b).

En aquellos cítricos que manifiestan síntomas de amarillamiento a pie franco (sin ser injertados), como el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), ocurre una necrosis de los tubos cribosos asociados a las células cromáticas del parénquima cercano al floema; esta necrosis es abundante en raíces laterales jóvenes y fibrosas. Una hiperactividad en el cambium está asociada con la necrosis, ocurre así una formación excesiva de floema y una reducción en la formación de xilema, lo que trae como consecuencia un deterioro de las raíces fibrosas (Schneider, 1959).

Cuando las plantas de naranjo dulce (*Citrus sinensis* Obs.) injertadas sobre naranjo agrio son infectadas por el CTV, ocurre una necrosis de los tubos cribosos por debajo de la unión del injerto, se bloquea la translocación, se deterioran las raíces, las plantas se marchitan y muestran un decaimiento (Schneider, 1959).

Las observaciones de Schneider fueron confirmadas 11 años después (Kitajima 1964, Kitajima, 1968). Se consolidó así la idea de que se trataba de un virus limitado al floema, sobre la base de estudios ultraestructurales. Posteriormente, la detección del CTV fue posible a través de la técnica de inmunofluorescencia al microscopio óptico (Sasaki, 1980; Tsuchizaki, 1978).

En 1965 se publicó una revisión de literatura sobre diversas inclusiones vírales (McWorter, 1965) y se vislumbró la posibilidad de su uso en el diagnóstico. Más tarde, al final de los 70 se recopila en un amplio estudio histológico las experiencias

acumuladas sobre inclusiones en plantas infectadas por diversos grupos de virus, indicando su utilidad con propósitos de diagnóstico (Christie, 1977; Edwarson, 1978). Más adelante, el método de tinción con Azure A es propuesto como una técnica de detección de rutina del CTV y se discuten sus ventajas sobre otros métodos de diagnóstico como el serológico, pruebas biológicas con limonero criollo y otras técnicas asociadas con el microscopio electrónico de transmisión (Garnsey, 1980).

Recientemente, se evaluó el efecto de cinco aislamientos de CTV, biológicamente diferenciados sobre siete hospederos diferentes del género *Citrus* (Brlansky, 1990). Después de aplicar el procedimiento de tinción con Azure A (Garnsey, 1980), se contabilizó el número de inclusiones y se determinó el título viral en cada muestra, utilizando la prueba inmunoenzimática ELISA (Brlansky, 1990). Se observó que sobre el limonero criollo (*C. aurantifolia* (Christm) Swing), las razas severas inducían un mayor número de inclusiones con respecto a las inducidas por los aislamientos moderados, los cuales a su vez también indujeron más inclusiones que las razas reconocidamente débiles. Se evidenció una correlación positiva entre el número de inclusiones y los valores de densidad óptica de las reacciones ELISA (Brlansky, 1990).

Se señala además, que las diferencias en el número de inclusiones formadas por varios aislamientos en diferentes especies de plantas puede reflejar la actividad biológica de un aislamiento viral en particular a nivel celular, el cual es expresado posteriormente en el tejido y en la totalidad de los estados de la planta (Brlansky, 1990).

Cuando en una región o país se hace endémico el CTV, la detección de razas débiles constituye una necesidad con la finalidad de utilizarlas en trabajos de protección cruzada; por lo cual, es de interés el comportamiento diferencial que diversas razas de este virus puedan presentar a nivel histológico. Esto permite con la ayuda de otros parámetros, definir a priori el daño que podríamos esperar de una

raza en particular, así como también caracterizar más acertadamente estas variantes vírales como severas, moderadas o débiles para un hospedero en particular.

2.7.3 Métodos serológicos

Los métodos inmunológicos son ampliamente utilizados en la detección de patógenos en áreas agrícolas. Un diagnóstico inequívoco depende de la afinidad y especificidad del anticuerpo utilizado, lo que permite realizar la detección de bajas concentraciones de un patógeno.

Las inmunoglobulinas (Ig) son una familia de glicoproteínas que se encuentran en el suero y otros fluidos de mamíferos y otros animales. Ellas forman parte del sistema inmune, son producidas en respuesta a un inmunógeno y funcionan como anticuerpo. Estas Ig poseen una estructura básica de cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas idénticas livianas y dos cadenas idénticas pesadas, arregladas en una estructura tipo "Y". La unión del antígeno al anticuerpo ocurre en el sitio " Fab", unión que es de tipo reversible y mediada por enlaces no covalentes.

Existen numerosas variaciones de la metodología de ELISA que se han descrito desde su desarrollo inicial en los años 60s, pero el concepto es básicamente el mismo. El ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas o ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), es una prueba confiable y rápida para la detección del VTC, ya que permite detectar en órganos de plantas, cantidades muy pequeñas de estos agentes (0.1%) y además permite estimar su concentración en el tejido enfermo.

La sensibilidad de ELISA es superior a otras pruebas serológicas, por lo que ha sido extensamente utilizada para la detección de patógenos en humanos, animales y plantas. Las pruebas serológicas como ELISA están basadas en la capacidad que tienen los agentes fitopatógenos (antígeno) para desencadenar la producción de inmunoglobulinas (anticuerpo) cuando son inyectados en organismos de sangre

caliente. Estos anticuerpos reaccionan específicamente con la proteína del patógeno inyectado.

Para la detección del VTC se utiliza la prueba denominada sándwich de doble anticuerpo (DAS) y consiste en la adsorción de anticuerpos específicos para el VTC a una placa de poliestireno. Los antígenos reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa; y para formar el sándwich se agregan nuevamente anticuerpos para detectar el VTC ligadas con enzimas que se adhieren a los antígenos capturados en la placa por otras moléculas de anticuerpos. Una vez formada la secuencia biológica de anticuerpo+antígeno+anticuerpo ligado a una enzima, se adiciona el sustrato, el cual es hidrolizado por la enzima dando lugar a un cambio de color de la solución y esto permite determinar los resultados visualmente y cuantificarlos espectrofotométricamente por medio de un lector de placas (Cruz, 1997). Se utilizan anticuerpos policlonales para la cobertura de la placa y monoclonales para el conjugado enzimático. Los policlonales reaccionan con la mayoría de variantes de este virus y los monoclonales (MCA13) detectan razas severas del VTC.

2.7.4 Métodos basados en la detección de ácidos nucleicos

El diagnóstico de fitopatógenos por medio de la identificación de sus ácidos nucleicos es un concepto que se ha desarrollado en las últimas dos décadas, por lo que nuevas aplicaciones, protocolos y modificaciones de las técnicas descritas están siendo reportadas continuamente en revistas de divulgación científica. Estas técnicas, sin embargo no están siendo utilizadas masivamente en laboratorios de diagnóstico debido al alto costo de sus reactivos, el requerimiento de equipo especializado y alto nivel de entrenamiento para su ejecución. Se espera, que la tecnología de detección de ácidos nucleicos llegue a ser más accesible y simplificada en el futuro. Por ahora, el inmunodiagnóstico es una alternativa económica, rápida, sensible y con una sensibilidad satisfactoria para ser usada en forma masiva.

El ácido desoxirribonucleico (DNA) y el ácido ribonucleico (RNA), son grandes moléculas formadas por la repetición de nucleótidos. (formado por una pentosa: ribosa o desoxirribosa; una base nitrogenada: púrica o pirimidíca y ácido fosfórico).

La molécula de DNA está constituida por dos largas cadenas de nucleótidos unidas entre sí formando una doble hélice. Las dos cadenas de nucleótidos que constituyen una molécula de DNA, se mantienen unidas entre sí porque se forman enlaces entre las bases nitrogenadas de ambas cadenas que quedan enfrentadas. La unión de las bases se realiza mediante puentes de hidrógeno, y este apareamiento está condicionado químicamente de forma que la adenina (A) sólo se puede unir con la Timina (T) y la Guanina (G) con la Citosina (C). La estructura del DNA se asemejaría a una "escalera". El esqueleto de la "escalera" estaría formado por el azúcar desoxirribosa y un grupo fosfato que haría de puente entre dos moléculas de desoxirribosa. Los peldaños de la "escalera" estarían formados por los cuatro tipos de bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina y timina.

2.7.4.1 Hibridación de ácidos nucleicos.

Una sonda de ácidos nucleicos consiste en una hebra simple de DNA ó RNA marcada con radioactividad ó algún método no isotópico, que ha sido construida para complementarse y unirse a hebras de DNA ó RNA blanco. Para emplear una sonda se debe fijar primero el extracto vegetal ó ácidos nucleicos parcialmente purificados a un soporte sólido tales como una membrana de nitrocelulosa ó de nylon. Los ácidos nucleicos "blanco" son desnaturalizados a hebra simple y posteriormente hibridados a la sonda marcada. Bajo condiciones apropiadas de temperatura y sales, la sonda es capaz de alinearse con el blanco de DNA ó RNA, para que después el híbrido de ácidos nucleicos de doble hebra sea detectado por medio de la visualización de la marca. Los ácidos nucleicos se pueden purificar parcialmente y después ser aplicados gota a gota a la membrana para una hibridación posterior, o aplicarlos

directamente al presionar el tejido vegetal sobre la membrana, simplificando el proceso de ejecución de esta técnica.

2.7.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La PCR ha sido aplicada a la detección e identificación de fitoplasmas, virus, viroides, hongos, bacterias y nemátodos. En general la aplicación de esta técnica al diagnóstico de enfermedades en plantas se ha centrado en organismos que no son fácilmente detectados por otros métodos o en aquellos casos en que la obtención de resultados es lenta.

Entre las ventajas que presenta esta técnica se destacan su sensibilidad (100 a 1000 veces más sensible que ELISA), la rapidez en la obtención de resultados y el potencial para detectar varios patógenos simultáneamente. Las desventajas son el alto costo de sus reactivos y equipos y la necesidad de un entrenamiento adecuado para su ejecución debido a la posibilidad de contaminación y la consecuente obtención de falsos positivos.

La posibilidad de utilizar varios primers en una reacción de PCR que den origen a productos amplificados de diferentes tamaños, abre la posibilidad de detectar varios patógenos en una misma reacción. Una variante de esta técnica se ha desarrollado recientemente, llamada PCR en tiempo real. Esta técnica cuantifica el ácido nucleico presente en la muestra y de esta forma se conoce la concentración del patógeno de interés (Levesque, 1997).

El desarrollo de la investigación en el área genómica, donde se utilizan microarreglos para establecer qué genes son sobre-expresados o silenciados después de un determinado tratamiento abre nuevas posibilidades en el área del diagnóstico de fitopatógenos. Recientemente se han desarrollado biochips compuestos de sondas de ácidos nucleicos ó anticuerpos arreglados en pequeñas áreas de vidrio. Este

formato es robusto y flexible y tiene además el potencial de incrementar la capacidad del diagnóstico ya que es posible detectar múltiples patógenos simultáneamente (Martín, 2000).

Sin duda, el descubrimiento y descripción de nuevos genes, moléculas o secuencias son la base para el desarrollo de nuevas herramientas que permitan realizar un diagnóstico rápido y preciso de enfermedades en plantas. Estos resultados serán también de vital importancia en la comprensión de las relaciones globales e interacciones existentes entre las plantas y sus patógenos u otros microorganismos asociados.

2.8 Caracterización de variantes del CTV

En primer lugar, la detección y el diagnóstico del CTV se llevaron a cabo durante años mediante pruebas biológicas consistentes en inocular limas mexicanas en condiciones controladas de invernadero. El método aún siendo sensible, era lento, caro y no permitía el análisis de gran cantidad de muestras.

Posteriormente se utilizaron pruebas de inmunodifusión con anticuerpos policlonales, formados a partir del CTV purificado, con buena especificidad al CTV (Garnsey, 1979). Los mismos investigadores utilizaron la prueba de ELISA (Bar-Joseph *et al.*, 1979a), para mejorar la eficiencia de detección del virus. Algunos investigadores (Lee, 1984; Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990), usaron patrones electroforéticos de formas de RNA replicativo de doble cadena (dsRNA) para detectar y caracterizar variantes del CTV; sin embargo, estos resultados no son tan convincentes cuando se trata de RNAs de CTV defectivos (virus incapaz de reproducirse en una célula huésped sin la ayuda de un virus auxiliar que aporta los genes que le faltan) Ayllon *et al.*, 1999. La comparación de aislados basada en sus perfiles de dsRNA tenía la limitación de que la presencia de bandas de la misma

movilidad electroforética no implicaba que tuviesen el mismo contenido genético, mientras que bandas de distinta movilidad podían tener información redundante.

El desarrollo de anticuerpos monoclonales (MCAs) (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990), fue uno de los principales avances en la diagnosis del CTV. El MCA 13 es especialmente útil para la detección de algunas variantes severas. La reacción positiva esta asociada con la declinación de árboles en Florida, el Oriente y América Latina, pero no en España y California. Por lo tanto, por primera vez fue posible analizar muchas muestras y detectar algunas variantes severas del CTV. No obstante no se pudo concluir lo mismo para muestras que presentaban picado del tallo, tipo declinamiento, o mezclas de estas variantes.

Usando el gen de la proteína de la cápside (CP) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), Gillings *et al.*, (1993) aplicaron los polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) a diferentes variantes del CTV. Ellos encontraron que la enzima *Hinf*1 digiere los productos de PCR del gen de la CP, produciendo siete diferentes patrones característicos, los cuales fueron asociados con actividades biológicas específicas. Esto permitió una categorización de variantes del CTV sin tener que clonar y secuenciar el gen de la CP.

Mawassi *et al.* (1993) y Pappu *et al.* (1993b) determinaron la secuencia nucleotídica de gen CP de diversas variantes del CTV. La clonación y secuenciación de genes individuales de la CP, para distinguir variantes del CTV, proporcionan mucha información; sin embargo es demasiado laboriosa y cara. Rubio *et al.* (1996) utilizó los polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) del gen de la CP para distinguir variantes del CTV, y Febres (1995) demostró esta utilidad para los genes p18, p20 y p27 del CTV. Los SSCP fueron desarrollados para detectar mutaciones puntuales en genes. La aplicación de este principio es simple y es relativamente económico. Los productos de PCR son desnaturalizados y corridos en una electroforésis de geles no desnaturalizantes. Cuando el DNA es desnaturalizado en cadenas sencillas en un gel no desnaturalizante, se forman enlaces

intramoleculares del hidrógeno (antes de anillarse a su cadena complementaria) y se separan basado en conformación relativa. Las dos cadenas son visualizadas por tinción de plata. Así las características y relación entre variantes del CTV pueden ser obtenidas por un simple, rápido y económico análisis electroforético.

El conocimiento del epítipo del MCA-13 proporcionó las bases para el desarrollo de sondas específicas para grupos de variantes del CTV. Así mismo, la hibridación molecular con sondas de cDNA, obtenidas mediante retro-transcripción, con primers al azar, tenía la limitación de no dar información sobre las zonas del genoma implicadas en la diferenciación de los aislados, ello hacía aconsejable iniciar un estudio preliminar sobre el genoma del virus.

La publicación en 1995 de la primera secuencia de un aislado de CTV (Karasev, *et al.*, 1995) permitió conocer los marcos de lectura abierta de este virus y la expresión de sus genes a través de la formación de RNAs subgenómicos 3'-coterminales. En 1996 se publicó la secuencia de un aislado de CTV de Israel, de características biológicas similares al T36 previamente secuenciado en Florida CTV (Karasev, *et al.*, 1995). Se vio que ambos aislados tenían la misma estructura del genoma y alta identidad de secuencia en la mitad del extremo 3', pero en cambio diferían hasta en un 40% de nucleótidos al aproximarse al extremo 5'. Los clones secuenciados del aislado español T- 385 cubren casi un 30% del genoma; su secuencia es la primera disponible de un aislado avirulento y guarda más similitud con el aislado de Israel que con el de Florida.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biología molecular y en los invernaderos del Centro Nacional de Referencia de Diagnostico Fitosanitario (CNRDF) de la Dirección General de Sanidad Vegetal

3.1 Colecta de muestras

Los muestreos se realizaron durante el período de 1983-2002, eliminando los brotes de acuerdo con la metodología establecida en la NOM-1995-FITO-031, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos, muestreandose huertas comerciales de las entidades de Baja California, Colima, Campeche, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Quintana Roo, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. Parte de las muestras colectadas se transportaron en hieleras a los invernaderos del CNRDF para inocular el virus en plantas de cítricos y para su análisis serológico por medio de la prueba de ELISA y métodos moleculares, respectivamente.

3.2 Aislamientos

Los aislamientos originales y características biológicas del CTV usadas para este estudio se muestran en el cuadro 3. Estos aislamientos fueron determinados como infectados por el CTV mediante la técnica serológica de ELISA, e inoculados en diferentes cultivares de cítricos para su conservación *in vivo* bajo condiciones de invernadero.

Cuadro 3. Aislamientos originales positivos por ELISA y propiedades biológicas (sintomatología) del CTV analizadas en este trabajo.

Aislado	Origen	Propiedades biológicas
ME1	Mexicali,* Baja California	Colectado en 1997 e inoculado en <i>Citrus volkameriana</i> / <i>Citrus latifolia</i> (Limón Persa), indujo picado del tallo y aclaramiento en nervaduras
CA2	Campeche	Colectado en septiembre del 2000 e inoculado en <i>Citrus volkameriana</i> / <i>Citrus aurantifolia</i> Limón Mexicano (Criollo), indujo moderado aclaramiento de nervaduras
CO3	Colima*	Colectado en el 2000 e inoculado en <i>Citrus aurantium</i> / <i>Citrus sinensis</i> (Naranja valencia), indujo en forma moderada aclaramiento de nervaduras.
JA4	Autlan el grullo y Atotonilco el alto Jalisco	Este material fue colectado en el 2002 y no fue inoculado en invernadero. No hay datos de síntomas.
MI5	Apatzingán Michoacán*	Colectado en 1997 e inoculado en <i>Citrus aurantium</i> / <i>Citrus sinensis</i> (Naranja valencia), indujo aclaramiento de nervaduras tenues
NA6	Santiago Ixcuintla Nayarit	Estas muestras provienen de limón Persa. No hay datos de síntomas
NL7	Montemorelos Nuevo León*	Este aislamiento fue inoculado en <i>Citrus aurantium</i> / <i>Citrus aurantifolia</i> (Limón mexicano criollo), indujo aclaramiento de nervaduras y ligero picado del tallo
QR9	Chetumal Quintana Roo*	Fue colectado en Mayo de 1997 e injertado en <i>Citrus aurantium</i> / <i>Citrus sinensis</i> (Naranja valencia), indujo aclaramiento de nervadura no se aprecia picado del tallo
TA10	Tamaulipas*	Colectado en 1983; inoculado en <i>Citrus aurantium</i> / <i>Citrus aurantifolia</i> , induce picado del tallo y aclaramiento del tallo.
VE11	Veracruz*	Colectado en 1994, Inoculado en <i>Citrus volkameriana</i> / <i>Citrus aurantifolia</i> , indujo un leve aclaramiento de nervaduras.
YU12	Ticul Yucatán*	Colectado en septiembre del 2000. Inoculado en <i>Citrus volkameriana</i> / <i>Citrus aurantifolia</i> , indujo un leve aclaramiento de nervaduras.

* Utilizados en plantas indicadoras.

3.3 Caracterización de variantes

3.3.1 Plantas indicadoras

Para determinar las variantes del CTV presentes en México, se utilizaron algunos aislamientos preservados (asterisco, cuadro 3). Los cuales se injertaron por personal del Laboratorio de virología en los invernaderos de CNRDF de la Dirección General de Sanidad Vegetal, el 26 de octubre de 1998 y el 9 de noviembre de 1999, en plantas indicadoras [limón mexicano (*Citrius aurantifolia*) sobre naranjo agrio (*Citrus macrophylla* Webster) y limón mexicano (*Citrius aurantifolia*) sobre limón (*C. volkameriana* Macf.)]. La transmisión se determinó mediante la prueba serologica de ELISA. La evaluación de síntomas se llevó acabo analizando tallos, ramas y hojas. La evaluación por secuencia nucleotídica fue hecha en CINVESTAV-Irapuato.

3.4 Extracción del RNA total

Con base en información existente, se evaluaron dos métodos de extracción de RNA total: uno comercial (TRIZOL® Reagent, Invitogen/ Life technologies) a base una solución mono-fasica de fenol e isotiocianato de guanidina, desarrollado a partir del método de Chomezynski y Sacchi, y un método de extracción universal de ácidos nucleicos. Se utilizaron las cortezas de brotes tiernos, peciolo y las nervaduras centrales de las hojas.

Método TRIZOL® Reagent, Invitogen/ Life technologies: Se pesaron de 50-100 mg/mL de tejido y se homogeneizaron en un mortero previamente estéril y congelado hasta pulverizar completamente. El homogenizado se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, el cual contenía 1 mL de TRIZOL® Reagent . Se mezcló vigorosamente y se incubó a temperatura ambiente (15 a 30°C) por cinco minutos,

para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas. Una vez incubado, se pasó a una centrífuga con refrigeración (0-4° C) a 12, 000 x g por 10 min, formándose dos fases: la pastilla conteniendo membranas extracelulares, polisacáridos y DNA de alto peso molecular y la fase acuosa que contenía el RNA. Se tomó todo el sobrenadante y se pasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se agregaron 0.2 mL de cloroformo (SIGMA) por 1 mL de TRIZOL® Reagent; se agitó vigorosamente por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 2 a 3 min. Posteriormente se centrifugó a 12, 000 x g durante 15 min a 4° C. Seguido de la centrifugación se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y estéril. El RNA se precipitó de la fase acuosa mezclando por inversión con 0.25 mL de isopropanol (SIGMA) y 0.25mL de solución de precipitación con alto contenido en sales (0.8 M de citrato de sodio y 1.2 M de NaCl) por 1 mL de TRIZOL® Reagent usado, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y centrifugó a no más de 12, 000 x g por 10 min a 4° C. Se retiró el sobrenadante y se lavó con 1mL de etanol 75% por 1ml de TRIZOL® Reagent. Se mezcló la muestra con agitación vigorosa (vortex) y se centrifugó a no más de 7,500 x g por 5 min a 4° C. Por último se retiró nuevamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla al aire de 5 a 10 min, disolviendo el RNA en agua libre de RNAsas (GIBCO BRL) y almacenó a -70°C.

Método de extracción rápida de RNA: En un mortero previamente estéril y congelado, se pulverizaron de 50-100 mg/mL de tejido, el macerado se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, el cual contenía 0.5 mL de buffer de extracción (50 mM de Tris-HCl pH 8.5, 10 mM de EDTA y 200 mM de NaCl); una vez resuspendido en vortex, se agregó 0.5 mL de una solución 50:50:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (GIBCO, BRL.) se agitó vigorosamente; posteriormente se incubó durante 10 min. Se centrifugó a 12,000 x g 10 min a 4° C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa (superior) a un tubo limpio evitando en todo momento la contaminación con material de la interfase y se precipitó el RNA agregando un volumen igual de isopropanol, se agitó por inversión e incubó a -70° C por 10 min. Luego se centrifugó a 12, 000 x g , 10 min a 4°C, se decantó el

sobrenadante y se lavó con etanol 70 %; se centrifugó por 5,000 x g por 5 minutos, se dejó secar la pastilla por no más de 10 minutos al aire. Por último se resuspendió la pastilla con agua libre de nucleasas.

3.4.1 Determinación de la concentración de RNA total

Una vez que el RNA fue resuspendido, se procedió a determinar su concentración en un espectrofotometro marca Spectronics Instruments con luz UV modelo Helios, colocando en una celda de cuarzo para luz UV 999µl de agua, se añadió 1µl de RNA, se mezcló bien por inversión y se tomaron las lecturas de absorbancia a 260 y 280nm (DO_{260/280}). Para determinar la concentración de RNA se realizó el siguiente calculo:

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{volumen total en la celda}}{\text{Volumen de la muestra}}$$

$$[\text{RNA}] = (\text{D.O. 260 nm}) (\text{Factor de dilución}) (40) / 1000$$

Una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 40 µg de RNA/ml. La concentración esta dada en µg/µl.

3.4.2 Determinación de la calidad del RNA total

Como parámetro de calidad se comprobó la relación entre los valores de las absorbancias a 260 nm y a 280 nm. Un ARN de buena calidad debe dar un valor entre 1.9-2.0.

3.4.3 Determinación de la integridad de RNA total

La integridad del RNA se determinó en un gel de agarosa (Invitogen Life technologies) al 0.8%, se utilizó buffer de corrida al TBE 0.5X (Tris-HCl 45mM, ácido bórico 45 mM y Na₂EDTA 1mM) igual que para la preparación del gel (Sambrook y cols, 1989), separándose el RNA a 80 volts (V) durante 30 min. El gel fue teñido con bromuro de etidio 1µg/ml (SIGMA) durante 10 a 15 minutos y se visualizó en un transiluminador de luz UV, de la marca ULTRA-LUM. Finalmente el gel fue fotografiado con un analizador de imágenes Kodak Digital Science para su análisis.

3.5 Diseño y síntesis de Iniciadores (oligonucléotidos).

Debido a que la gran parte del genoma del CTV es conocido, el diseño de los iniciadores esta basado en las secuencias reportadas. Los iniciadores que se utilizaron alinean en la porción de DNA de los genes p13 (PM46 Positiva CCG TTG TAA TAA TCT CGT C; PM47 Negativa AGA CTC TAG TTA TCG CAA GGT), p20 (p20A Positiva ACA ATA TGC GAG CTT ACT TTA; p20B Negativa AAC CTA ACA GCA AGA TGG A) y p23 (p23A Positiva GCT AGC ACC ATG GAT AAT ACT AGC GGA C, p23B Negativa AGA TCT TCA GAT GAA GTG GTG TTC) del CTV, los cuales fueron diseñados por la Bioquímico Liset Herrera de CINVESTAV-U Irapuato y sintetizados por la compañía SIGMA.

La capacidad de pareamiento de las secuencias utilizadas se verificó mediante un programa de INTERNET del Banco de Genes (GenBank versión 105.0+, abril 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de la Biblioteca de Medicina dependiente del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica.

3.6 Transcripción inversa y Reacción en cadena de la polimerasa acoplado, (RT-PCR).

Para esta reacción se llevó a cabo la formación del DNA complementario (cDNA) al RNA mediante el uso de una enzima DNA polimerasa dependiente de RNA (reverso transcriptasa). Existen varias enzimas de este tipo en el mercado siendo las más conocidas la AMV obtenida del Virus de Mieloblastosis Aviar, la M-MLV purificada del Virus de la Leucemia Murina de Maloney, la rTth procedente de *Thermus thermophyllus* y la SuperScript II. Para la síntesis del cDNA para los diferentes genes de interés, se incubaron 3 μ L de RNA de cada uno de los aislamientos a 70° C por 5 min. Se prepararon mezclas (25 μ L) que contenían 1x PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 10mM de Ditionitrol (DTT), 2.5 mM de MgCl₂, 250 μ M de cada uno de los cuatro dNTPs, 2.5 U Taq DNA polimerasa, 100 U de M-MLV reverso transcriptasa (Promega) obtenida del Virus Leucemia Murina de Maloney y 10 pmoles de cada primer específico, al final se agregaron 25 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación.

El programa térmico de PCR para el termociclador (Personal cycler, Mod. 050-500 Biometra) fue el mismo para los tres pares de primers analizados: 42° C 45 min (síntesis de cDNA); 94° C 5 min; 94° C 1 min; 53° C 1 min; 72° C 1 min. (35 ciclos) con una extensión final de 72° C 10 min, almacenándolo a 4° C.

Nota: Todos los reactivos utilizados para estas reacciones de RT-PCR fueron de la marca Promega e Invitrogen Life technologies.

3.7 Análisis de los productos de la reacción.

La amplificación de las muestras se verificó fraccionando el DNA en un gel de agarosa de 1 a 1.3% en buffer TAE 1X (Tris 40 mM, acetato de sodio 20mM y Na₂EDTA). Por lo cual se eliminó el aceite mineral del producto de PCR y se

mezclaron las muestras con buffer de carga (0.025 % azul de bromofenol, 0.025% xilencianol, 30% de glicerol en agua) para cargarse en el gel. Se separó el DNA a 100 volts durante 15-30 minutos o cuando el colorante celeste (xilencianol) exceda un poco más de la mitad del gel. En cada corrimiento se colocaron los testigos negativos (agua), positivos (plásmido aislamiento Veracruz) y un marcador de peso molecular conocido. Este último sirvió para calcular el tamaño del fragmento amplificado y comprobar si fue el esperado. Finalmente, el gel se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/mL durante 10 a 15 minutos y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

3.8 Análisis genético de las variantes de VTC por el método de polimorfismos Conformacionales de Cadena Sencilla (SSCP).

Para los ensayos de SSCP se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida utilizando cámaras verticales con dimensiones del gel de 16X18 cm, marca Hoefer Scientific Instruments SE400 y una fuente de poder marca BIORAD modelo 200/2.0

PAGE nativo al 12%. Después de ensamblar los cristales previamente lavados y desengrasados, para recibir la solución a polimerizar; en un vaso de precipitado de 50 mL se mezclaron las soluciones señaladas en el cuadro 4. Se transfirió la mezcla a las placas de cristal y se colocó el peine para dejar polimerizar por lo menos durante una hora. Transcurrido este tiempo, se removió el peine y se ensamblaron las placas de cristal con el gel en la cámara de electroforesis enjuagando los orificios dejados por el peine con solución TBE 0.5X (Tris -HCl 45mM, ácido bórico 45 mM y Na₂EDTA 1mM). Se precurrió el gel a 100 V durante 15 minutos.

Cuadro 4. Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 12%

Soluciones/Volumen (mL)	30 mL
Acrilamida 30% (mL)	12.0
Agua bidestilada estéril (mL)	11.79
TBE 5X	6
Persulfato de amonio (μ L)	210
TEMED (μ L)	10.5

Análisis SSCP. El análisis SSCP fue realizado directamente de los productos de PCR de los genes p13, p20 y p23. Se utilizaron 2 μ L de producto de PCR, y mezclaron con 8 μ L de buffer desnaturalizante (Formamida 95% y azul de bromofenol 0.05%). Esta mezcla se calentó 10 minutos a 95°C con agitación a los 5 minutos, posteriormente se enfrió rápidamente en hielo. Las muestras se fraccionaron en un gel de poliacrilamida al 12% en la cámara de electroforésis vertical, en buffer TBE 0.5X como amortiguador de corrida. La electroforésis se corrió a 200 volts durante toda la noche o 12 hrs.

Tinción del gel de poliacrilamida con nitrato de plata. Se colocó el gel en un contenedor y se agregaron 100 mL de solución fijadora (10% de etanol y 2% de ácido acético) durante 20 minutos con agitación constante. Se eliminó la solución fijadora y el gel se lavó tres veces con agua destilada. Agitando ligeramente durante los lavados. Se decantó el agua y se agregaron 100 mL de solución de tinción (Nitrato de plata al 2%) por 20 minutos con agitación ligera y el gel se lavó de tres a cuatro veces. Enseguida se agregaron 100mL de solución reveladora (6% de hidroxido de sodio y 2% de formaldehído) y se mantuvo en agitación suave hasta que aparecieron las bandas. La reacción se detuvo con una solución al 2% de ácido acético.

IV. RESULTADOS

4.1 Biocaracterización de aislados mexicanos del CTV

Al evaluar la actividad biológica (manifestación de síntomas) del CTV en lima mexicana como patrón (cuadro 5), se encontró lo siguiente:

Cuadro 5. Sintomatología del CTV en diferentes injertos en arboles de 7 años de edad, utilizando como patrón Lima Mexicana (*Citrus aurantifolia*).

Aislamiento	No. Plantas analizadas	a) Aclaramiento de nervadura (%)	b) Acanaladura de rama (%)	c) Picado del tallo (%)
Veracruz	12	30	0	0
Q. Roo	8	38	0	0
Yucatán	4	58	0	0
Michoacán	12	45	12.5	0
Nuevo León	12	58	8.3	10
Colima	12	67	33	50
B. California	12	66	33.3	55
Tamaulipas	12	100	89	70

a) Aclaramiento de nervaduras. Hubo aclaramiento en áreas pequeñas de las hojas jóvenes y en forma generalizada a lo largo de las nervaduras secundarias y terciarias; principalmente con los aislamientos de Tamaulipas (100%), seguida de Colima (67%) y Baja California (66%); y en menor grado Yucatán y Nuevo León (58%).

b) Acanaladura de rama. Al despegar la corteza, se observa una depresión que constituye la acanaladura (el cambium vascular del tejido secundario es invadido, y algunas células cámbiales y sus derivadas inmediatas se colorean y otras se hipertrofian, formándose una masa de células hipertrofiadas del parénquima con

células cromáticas ocasionales en el lugar donde deberían formarse el xilema y el floema). Este síntoma apareció principalmente en el aislamiento Tamaulipas de forma generalizada en ramas.

c) Picado del Tallo. Se presentó principalmente en Tamaulipas y en menor grado en los aislamientos de B. California, Colima y N. León. La causa del picado del tallo esta asociada con sobre crecimientos del tejido de la corteza y la agregación de cuerpos de inclusión viral, dando como resultado depresiones a manera de hoyos sobre la madera del tallo.

El uso del limón mexicano para la detección de variantes del CTV, tiene como desventaja el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la aparición de síntomas, por lo que es necesario otro tipo de análisis más específico y rápido como la caracterización genética.

4.2 Caracterización genética

4.2.1 Extracción del RNA total.

El análisis del RNA se realizó mediante dos procedimientos que son ampliamente usados: a) estimación de la cantidad y pureza (calidad), mediante espectrofotometría de luz UV y b) grado de degradación (integridad) por medio de la fluorescencia que emite el Bromuro de etidio cuando está mezclado con el RNA; este compuesto químico tiene afinidad por moléculas de doble cadena que se intercala en los puentes de hidrogeno, de manera que al irradiar el gel con una fuente de luz UV se puede observar la ubicación, integridad e indirectamente la cantidad. Esta estimación, se puede llevar a cabo debido a que la fluorescencia emitida, es proporcional al total de la masa del RNA (Valadez y Kahl, 2000).

En el primer caso las cantidades de RNA genómico y viral se determinaron en un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda BIO/10), tanto en muestras frescas (sin deshidratar) y secas (deshidratadas a temperatura ambiente) cuadro 6 a y b. Cabe señalar que en los dos métodos de extracción utilizados se aplicaron en diferentes tejidos vegetales como se indicó en el capítulo de Materiales y Métodos.

Cuadro 6a: Calidad y concentración de RNA total de muestra fresca, leída en el espectrofotómetro.

Método	260nm	280 nm	Calidad	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Trizol Reagent	0.079	0.045	1.75.	1.58
Extracción Rápida de RNA	0.084	0.055	1.53	1.68

Cuadro 6b: Calidad y concentración de RNA total de muestra seca, leída en el espectrofotómetro.

Método	260nm	280 nm	Calidad ($\text{DO}_{260/280}$)	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Trizol Reagent	0.040	0.020	2.0	0.80
Extracción Rápida de RNA	0.063	0.056	1.12	1.26

Al observar los rendimientos individuales del RNA total en cada muestra (seca y fresca), se puede ver una diferencia entre ambos métodos ya que con el trizol reagent® se obtuvo menor cantidad de RNA; sin embargo en cuanto a la pureza superó al método de extracción rápida de RNA. Este parámetro fue evaluado mediante la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm ($\text{DO}_{260/280}$), la cual debe estar entre 1.8 y 2.0 para ser consideradas de buena calidad; mientras que si hay

contaminación con proteínas o fenol. El valor obtenido en esta relación puede ser significativamente diferente para los valores citados arriba y no será posible la cuantificación correcta del RNA (Sambrook y cols., 1989) Estos resultados indican que el método comercial es más efectivo para la eliminación de compuestos fenólicos, proteínas y otras sales que pudieran intervenir en la amplificación por medio de la reacción de PCR como lo reportan Valadez y Kahl (2000).

Como se observa en los cuadros (6a y b), el utilizar tejido fresco como fuente de obtención de RNA, fue determinante ya que las cantidades de RNA obtenidas fueron mayores, esto correspondió con lo reportado por Henry (1997) y Kurt *et al.*, (1995); sin embargo, esto no siempre es posible, porque el método de deshidratado (secado) es esencial para mantener la integridad y manejo del tejido tal como lo indica la NORMA Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000. Por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Por otro lado, se debe de tomar en cuenta que las nucleasas presentes en las células pueden causar degradación del RNA (Thomson y Henry, 1993) y esto explicaría los bajos rendimientos por ambos métodos en muestra seca (Cuadro 6a y b). A pesar de esto, es posible trabajar con corteza, hoja o peciolo que estén almacenados por varios años (Clarke *et al.*, 1989).

En relación con el nivel de degradación del RNA, en la figura 3 se muestra una fotografía de un gel no desnaturalizante de agarosa al 0.8% conteniendo una alícuota de RNA total obtenido con los 2 métodos a partir de muestras secas y frescas de diferentes plantas de cítricos. El RNA obtenido por ambos métodos no se encuentra degradado ya que se pueden ver los RNAs ribosomales 28S y 18S. En contraste el RNA degradado o parcialmente degradado, forma un barrido (parecido a una mancha) de fragmentos de diferentes peso molecular a lo largo del carril, haciendo que las bandas citadas, pierdan nitidez o no se aprecien (Valadez y Kahl, 2000).

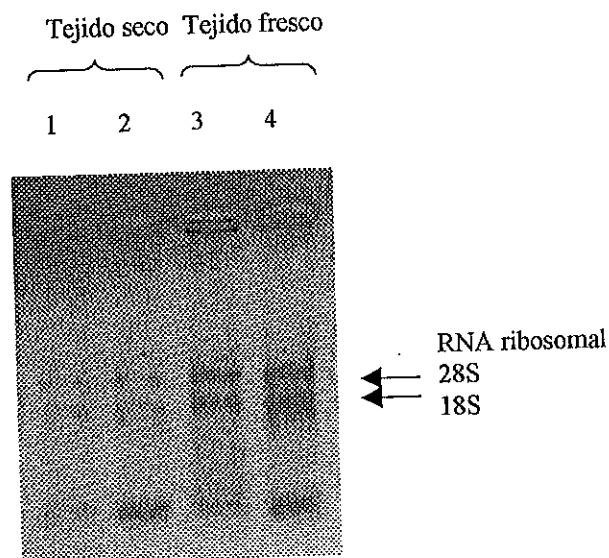


Figura. 3 RNA total, obtenido por dos métodos de extracción a partir de corteza del cítrico, visualizados en gel de agarosa no desnaturizado al 0.8% y teñido con bromuro de etidio. Líneas 1 y 3) metodo Trizol Reagent®, tejidos secos y frescos; Líneas 2 y 4) Método de extracción rápido de RNA, en tejidos secos y frescos respectivamente.

En términos generales los dos métodos evaluados fueron aceptables; sin embargo, el que se utilizó para esta investigación por rápido, práctico y las características antes mencionadas fue el TRIZOL REAGENT®

4.3 RT-PCR

La reacción de RT-PCR, previamente estandarizada, se efectuó con los diferentes pares de iniciadores que amplifican diferentes genes del CTV. Para cada par de primers se utilizaron los mismos parámetros de reacción de RT-PCR y programa térmico, como se indicó en el capítulo de materiales y métodos, produciendo bandas consistentes y libres de fragmentos inespecíficos (Fig. 4).

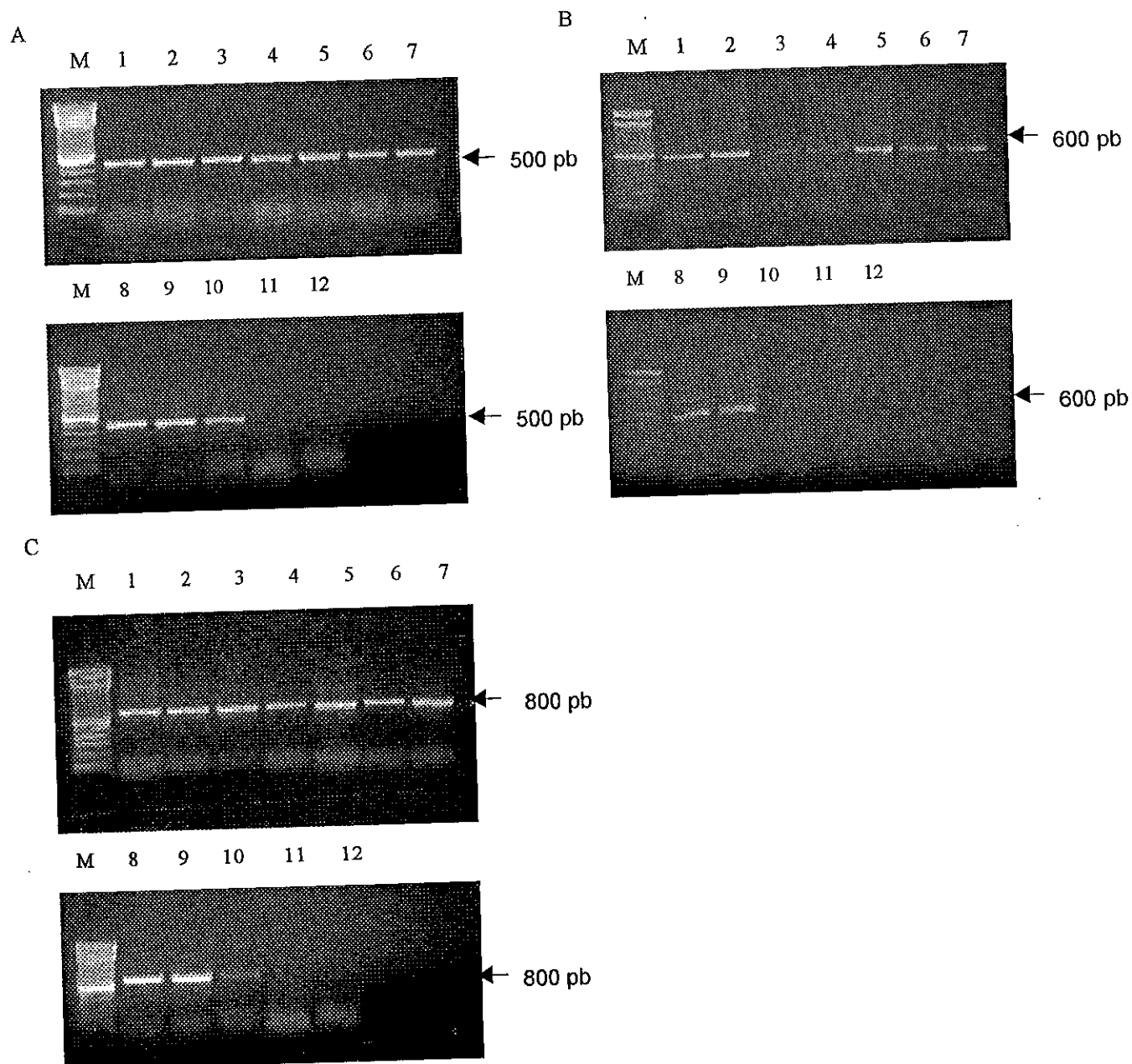


Fig. 4. Representación de los fragmentos amplificados por RT-PCR usando los primers específicos para el gen p13 (A), gen p20 (B) y gen p23 (C) del CTV amplificando un fragmento de 500 pb, 600 pb, y 800 pb respectivamente de diferentes aislados de cítricos infectados con el VTC. Línea M= Marcador de peso molecular Ladder 100 GIBCO BRL; Línea 1= Jalisco; Línea 2= Chetumal; Línea 3= Campeche; Línea 4= Nayarit; Línea 5= Veracruz; Línea 6= Colima; Línea 7= Yucatan; Línea 8= Mexicali; Línea 9= Tamaulipas; Línea 10= Michoacan; Línea 11 y 12= controles negativos.

Como se puede observar, con los iniciadores que amplifican el gen p13 se obtuvo un fragmento de 500 pares de bases (pb); para los del gen p20 se amplificó una banda de aproximadamente 600 pb con el gen p23 presentó un fragmento de 800 pb, tal como lo menciona Herrera, *et al.* (2003) al diseñar estos iniciadores.

Para determinar la especificidad se alinearon con anterioridad en el banco de genes (GenBank versión 105.0+, abril 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con el uso de estos primers se observó buena intensidad de banda para todas las plantas infectadas. En plantas sanas (testigos negativos) no se observaron productos de amplificación lo que indicó la especificidad de los primers utilizados para la detección de los diferentes genes del CTV. La estimación del tamaño de los fragmentos genómicos amplificados del CTV se efectuó al compararse con el marcador de peso molecular DNA Ladder 100 bp (GIBCO, BRL).

Cuando se realizaron las primeras amplificaciones (estandarización), probando los dos métodos de extracción de RNA total, no hubo diferencias, puesto que en los dos métodos se tuvo amplificación, contrario a lo que se esperaba, que por la simplicidad no eliminarían por completo los compuestos fenólicos y polisacaridos que pudieran haber inhibido la actividad de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Sambrook *et al.* 1989); lo que indicó que estos métodos los removieron total o parcialmente y no interfirieron en la amplificación por PCR.

Las amplificaciones obtenidas de RT-PCR acoplado de los aislamientos antes mencionados con los diferentes pares de primers (p13, p20 y p23), fueron satisfactorias. Estas regiones son una buena opción para buscar variación en los genomas de aislamientos del CTV, y pueden ser de ayuda para la diferenciación entre los aislamientos, o una detección múltiple (PCR múltiplex), dando la ventaja de amplificar varios genes a la vez y de esta manera reforzar la diferenciación de variantes de este virus. (Herrera, *et al.*, 2003)

4.4 Análisis SSCP

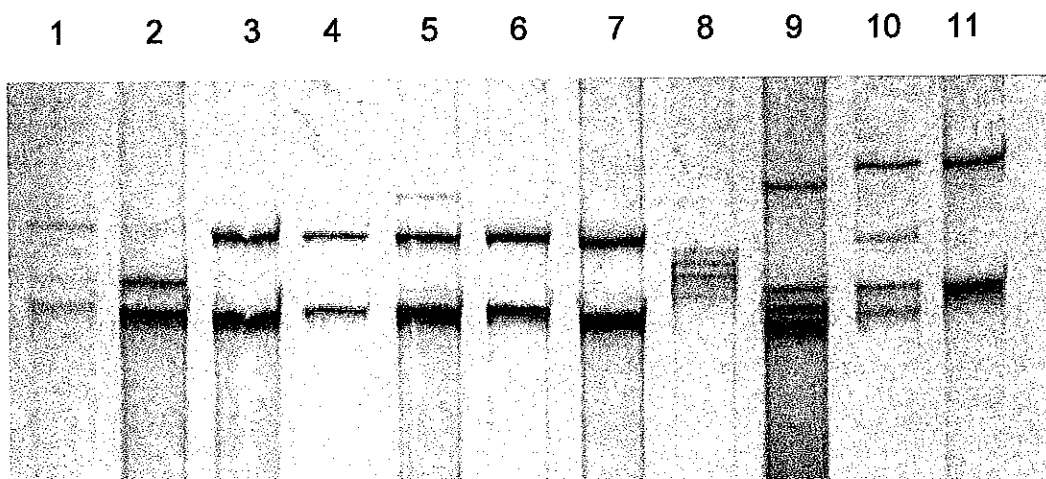
4.4.1 Detección de diferencias conformacionales de aislamientos del CTV

En la figura 5a, se presentan los patrones polimórficos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), obtenidos del DNA complementario (cDNA) amplificado con los iniciadores IRA1 e IRA2, específicos del gen p23. En ella se observa que los aislados obtenidos de Jalisco, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Veracruz, Colima y Yucatán (carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7), agrupados para este estudio como "electroferogrupo 1", presentaron una migración electroforética similar, en contraste con los de Mexicali y Tamaulipas (carriles 8 y 9), agrupados en electroferogrupo 2 y 3 respectivamente; los cuales presentaron una migración desigual para cada grupo, diferente al observado en el electroferogrupo 1, de igual forma los aislados Nuevo León y Michoacán (carriles 10 y 11), ambos migraron de forma similar pero con movilidad electroforética diferente a los electroferogrupos 1, 2 y 3, por lo que este patrón electroforético se le ubicó en el electroferogrupo 4.

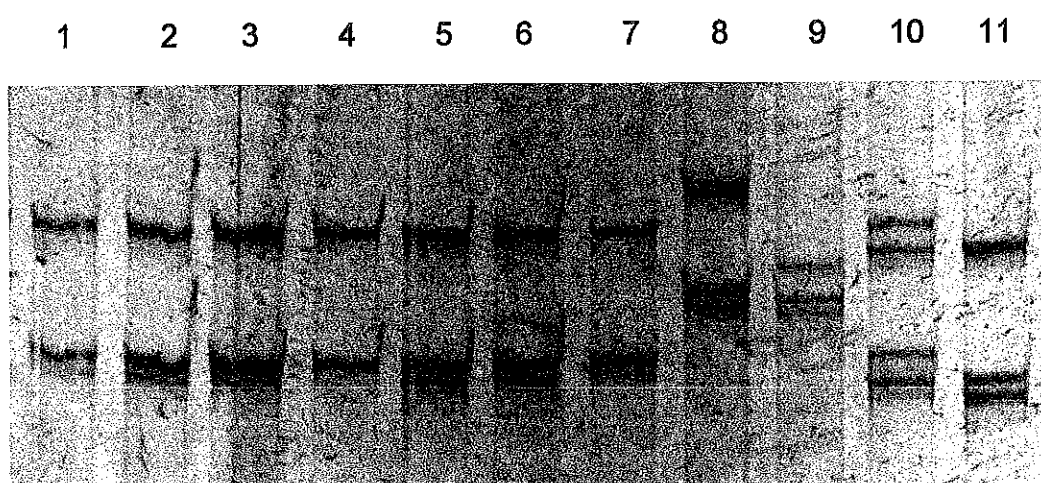
Los SSCP, obtenidos a partir de los fragmentos amplificados con los iniciadores específicos del gen p13, tuvieron un comportamiento similar a los del p23; presentando la misma migración para los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, (electroferogrupo 1), migración diferente aislamientos de los carriles 8 y 9 (electroferogrupos 2 y 3), y migración electroforética similar para los aislados de los carriles 10 y 11 (electroferogrupos 4), pero con diferente movilidad que los electroferogrupos 1, 2 y 3. (figura 5b).

Los patrones obtenidos con el cDNA amplificado con los iniciadores para el gen p20, arrojaron información similar a la de los patrones electroforéticos del gen p23 y p13, sin embargo, se detectó una variación, de tal forma que se obtuvieron 5 electroferogrupos, teniendo el electroferogrupo 1 con los aislamientos de los carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, los electroferogrupos 2, 3, 4 y 5 con los aislamientos de los carriles 8, 9, 10 y 11 respectivamente, estos últimos presentaron movilidad electroforética diferente para cada uno de los cinco aislamientos (figura 5c).

Panel A



Panel B



Panel C

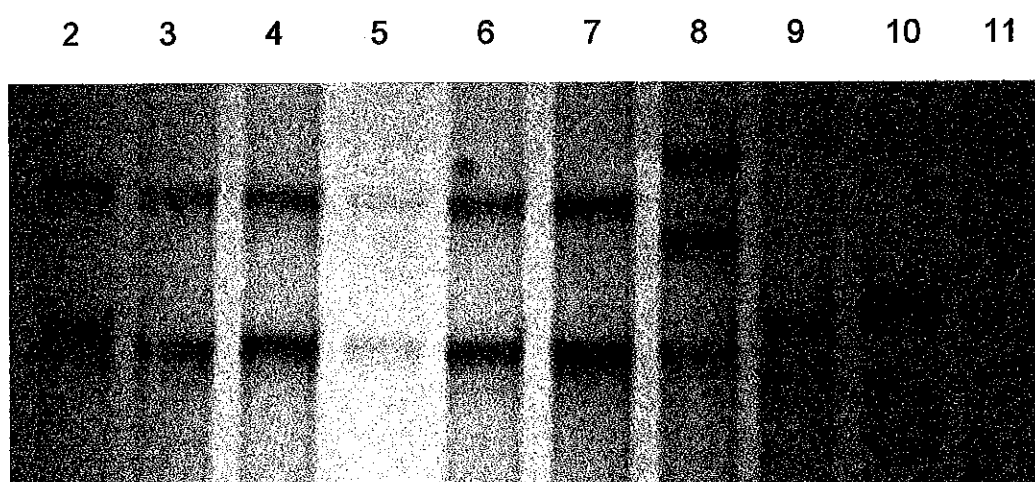


Figura 5. Análisis de patrones SSCP de los productos de amplificación mediante RT-PCR a partir de primers específicos para el gen p23 (panel A), p13 (panel B) y p20 (panel C) del VTC de aislamientos Mexicanos: Línea 1 Jalisco; Línea 2, Chetumal; Línea 3, Campeche; Línea 4, Nayarit; Línea 5 Veracruz; Línea 6, Colima; Línea 7, Yucatán, (electroferogrupo 1); Línea 8, Mexicali (electroferogrupo 2); Línea 9, Tamaulipas, (electroferogrupo 3); Línea 10, Michoacán y Línea 11, Nuevo León (electroferogrupo 4). Y en p20 (panel C) Línea 10, Michoacán (electroferogrupo 4) y Línea 11 Nuevo León (electroferogrupo 5). En geles de acrilamida al 12% y teñidos con nitrato de plata.

V. DISCUSIÓN

Los síntomas observados en limón mexicano, como planta indicadora, fueron un indicio que hizo sospechar de la existencia de un complejo viral en los aislamientos del CTV en las plantas evaluadas. Los síntomas predominantes fueron aclaramiento de nervaduras (variante tipo débil) y únicamente dos aislamientos (Baja California y Tamaulipas) mostraron acanaladura de ramas y picado del tallo (variante tipo severo o declinamiento). Esta clasificación se hizo de acuerdo a Garnsey *et al.*, (1987) quien dividió algunos aislamientos del CTV en variantes débiles y severas dependiendo de los síntomas inducidos en cinco plantas indicadoras. En contraste, Moreno, *et al.*, (1993); Rocha-Peña *et al.*, (1994 y 1995) y Niblett *et al.*, (2000) manejaron otra clasificación: variantes suaves, declinamiento, picado del tallo y amarillamiento de plántulas). En este estudio, solo se observaron dos tipos de síntomas; esto probablemente a las plantas indicadoras utilizadas (limón mexicano como portainjerto). En este sentido, experimentos realizados por Rubio, *et al.*, (2000), indicaron que el cambio de hospedero a menudo induce cambios en poblaciones de RNA genómico del CTV.

La inoculación en plantas indicadoras ha sido el método más utilizado para la clasificación de aislamientos de este virus (Garnsey *et al.*, 1989). La principal desventaja del indexado biológico es el tiempo requerido, ya que la primera evaluación de sintomatología se realizó después de 2 años de la inoculación (Lee *et al.*, 1994; Rocha-Peña *et al.*, 1995). Además, de esta desventaja Niblett, *et al.*, (2000) reportaron que el método es caro, por el espacio utilizado en invernadero, manejo de enfermedades, plagas y personal técnico especializado.

El uso de otros métodos para el estudio de variantes como ELISA (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990) fue muy importante en la diagnosis del CTV; sin embargo, los anticuerpos (MC13) no reaccionaban con la mayoría de las variantes severas reportadas (Niblett, *et al.*, 2000). Por otro lado, los patrones electroforéticos de formas replicativas de RNA de doble cadena, fueron utilizados para separar variantes (Lee,

1984; Dodds *et al.*, 1987; Moreno *et al.*, 1990); pero presentaron algunos problemas debido a la generación de RNAs defectuosos de CTV (Ayllon *et al.*, 1999).

Los fragmentos polimórficos en la longitud de restricción -RFLP- (Gillings *et al.*, 1993), producen diversos patrones característicos que se asociaron con actividades biológicas específicas, los cuales permitió una clasificación de las variantes del CTV; no obstante a que la simple digestión de restricción demostró que no tiene acceso a toda la variación de variantes examinadas.

La reacción en cadena de la polimerasa aún no tiene primers específicos confiables para la diferenciación de variantes (Mawassi *et al.*, 1993; Pappu *et al.*, 1993); aunque Ayllón *et al.*, (2001) hicieron mención que mediante PCR discriminó mezclas con variantes severas tipo T36.

La clonación y secuenciación de variantes de uno o más genes, pueden ser un procedimiento preciso para caracterizar poblaciones de CTV, pero es costosa, laboriosa y consume mucho tiempo para identificación de rutina de éstas; sin embargo, da información de las diferencias puntuales en las secuencias, tal y como lo determinó Herrera *et al.*, (2003) al secuenciar la parte central del gen p13 de diferentes aislamientos de CTV de origen Mexicano, quien encontró que los aislamientos de comportamiento suave difirieron de los severos en solo 5 bases nitrogenadas:

suaves: TTC TgA gAg Cgg TAg CTC gTC Cgg TTC CAT CT

severas: CTC TgA gAg Cgg TCg TTC gTT Cgg TTC CAT TT

En la ultima década, el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP), se han utilizado por ser considerado como un método sensible, económico y rápido para detectar la variación de la secuencias (Niblett, *et al.*, 2000).

El método está basado en la detección electroforética de los cambios de conformación del DNA monocatenario, resultado de mutaciones puntuales u otras formas de cambios en la secuencia (Orita, *et al.*, 1989). La técnica ha sido exitosa en la detección de diferencias nucleotídicas en el gen p25 (PC) y p27 de diferentes aislamientos del CTV (Rubio *et al.*, 1996; Gago-Zachert *et al.*, 1999), análisis genómico de poblaciones y su variación después del cambio de hospedero (Ayllón *et al.*, 1999b; Rubio *et al.*, 2000), y después de la transmisión por áfidos (Moreno, G. *et al.*, 1996; Albiach-Martí, *et al.*, 1999; d'Urso, F. *et al.*, 2000).

En cuanto al método de laboratorio utilizado para observar los patrones SSCP; Rubio, *et al.*, (2000), indicó que la presencia de diferentes variantes de RNA en la mezcla del aislamiento no altera la eficacia del amplificado. Así, cuando diferentes proporciones de RNA de cadena doble de dos variantes del CTV fueron utilizadas como molde para RT-PCR y el DNA complementario (cDNA), fueron sintetizadas y analizadas por SSCP; la intensidad de las bandas de los patrones SSCP fue proporcional a la concentración de las variantes correspondientes. Además que para este estudio se estandarizaron previamente las condiciones de SSCP, para que la conformación del DNA no fuera alterada por el buffer de electroforesis, voltaje, temperatura y concentración de acrilamida, los cuales podrían alterar la movilidad electroforética tal y como lo sugiere Gago-Zechert, *et al.*, (1999).

Los patrones SSCP obtenidos en este estudio de los aislamientos mexicanos del CTV, permitieron discriminar cuatro electroferogrupos con los genes p13, p23 y cinco electroferogrupos con el gen p20 del CTV, permitiendo agrupar a los aislamientos de Jalisco, Quintana Roo, Campeche, Nayarit, Veracruz, Colima y Yucatán como variantes tipo suaves para los 3 genes evaluados (electroferogrupo 1).

Al comparar la actividad biológica de los aislamientos Veracruz, Quintana Roo y Yucatán (aislamientos evaluados en invernadero), únicamente producen aclaramiento de nervadura, confirmándolo con el análisis filogenético de las secuencias correspondientes a marcos de lectura (ORFs) 1ª, CP, P13 y P23,

realizado por Herrera, *et al.*, (2003) quienes agruparon a Yucatán, Veracruz, Q. Roo, Michoacán, Nuevo León y Colima, y los situaron más cerca de aislamientos de comportamiento reportado como suave (Florida B35, T30 y España T385). Cabe señalar que el aislamiento Colima presenta un alto porcentaje de acanaladura de rama (33%) y picado del tallo (50%), esto se puede explicar, debido a que dicho aislamiento presenta una mezcla con variantes severas como lo revela la secuenciación con el gen p13 y la amplificación de la variante severa tipo VT (Herrera *et al.*, 2003); sin embargo, mediante SSCP no se distinguió mezcla de ninguno de los genes evaluados. Esto es explicable porque con esta técnica solo es posible detectar hasta un 10 % de la variante mezclada (Rubio, *et al.*, 2000) y tal vez en este aislamiento predominaba la variante suave.

Los aislados de Tamaulipas y Baja California Norte (electroferogramas 2 y 3, respectivamente), presentaron patrones únicos para cada caso con los genes p13, p20 y p23. De acuerdo a su sintomatología, ambos aislamientos presentaron aclaramiento de nervaduras, picado y acanaladura del tallo (moderado severo); confirmándolo por lo reportado por Herrera, *et al.*, (2003), quienes agruparon a estos aislamientos con los aislamientos considerados como severos de Colombia, Texas y Florida T3, además de la evidencia que proporciona la PCR detectando variantes severas tipo T36 y VT.

Por último, los genes p13 y p23 presentaron una banda tipo SSCP similar para los aislamientos Michoacán y Nuevo León (electroferograma 4). La sintomatología presentada por el aislamiento Nuevo León fue aclaramiento de nervaduras, picado y acanaladura de ramas y Michoacán solamente mostró aclaramiento de nervaduras y acanaladura de tallo; sin embargo, Herrera, *et al.*, (2003) ubicó por secuenciación a estos aislamientos como variantes suaves, aunque hace mención que mediante PCR (Ayllón *et al.*, 2001) encontró mezclas con variantes severas tipo T36.

Con el gen p20, se produjo una mezcla de patrones SSCP para los aislamientos Michoacán (electroferograma 4) Nuevo León (electroferograma 5). Esto se puede

explicar debido a que los virus de RNA tienen un gran potencial de variación genética como resultado de sus amplias poblaciones, RNA polimerasa propensa a error y tiempos cortos de replicación. (Domingo y Holland, 1994). De la misma forma, Dolja & Carrington, (1992); Koonin & Dolja, (1993); Gibbs, (1995); Roossinck, (1997); Garcia-Arenal *et al.*, (2001) indicaron que la elevada tasa de mutación de los virus de RNA produce una acumulación de deleciones, limitando el tamaño del genoma de RNA; que en poblaciones amplias la capacidad puede mantenerse o incrementarse por selección natural; pero en pequeñas poblaciones, la deriva génica puede conducir a la pérdida progresiva en la capacidad de replicación; que la recombinación de genomas vírales con mutaciones deletorias puede regenerar la funcionalidad del genoma; que para el CTV, que tiene un genoma de los más grandes entre los virus de plantas de cadena sencilla de sentido positivo, en donde la recombinación puede actuar como un mecanismo compensatorio contrarrestando la acumulación de mutaciones deletorias y que también la coinfección y recombinación de diferentes regiones genómicas entre genomas del CTV permite mayor diversidad y adaptabilidad a los nuevos ambientes (Rubio, *et al.*, 2001).

Del mismo modo, Domingo & Holland (1994), mencionaron que aunque el índice de error de las diferentes polimerasas vírales del RNA es similar, la diversidad genética puede diferir entre variantes, lo que demuestra que en la región del gen p20 de los aislamientos Michoacán y Nuevo León, tuvieron un cambio en su secuencia y por ende su conformación electrofororética cambió. Estos resultados, siguieron una vía indirecta para designar heterogeneidad en la población.

Los aislamientos de CTV de Jalisco y Chetumal presentaron una mezcla de patrones SSCP (no reconocida) con el gen p23, esto se puede afirmar, debido a que presentaron más de dos bandas. En estudios, realizados por Rubio *et al.*, (2000) y d'Urso (2000) observaron que los patrones SSCP con más de dos bandas de DNA indicaron la presencia de más de una secuencia variante en la población; y que la intensidad de las bandas de DNA refleja el título de la correspondiente variante en la población. El aislamiento del CTV de Veracruz [suave], presentó bandas similares

a las del aislamiento Tamaulipas [severo]; la cual se confirma con los hallazgos encontrados por Herrera, *et al.*, (2003) quienes encontraron por PCR, la mezcla de esta variante suave con variante severa tipo T36.

El aislamiento Michoacán. Con ambos genes (p23 y p13), presentó dos bandas que correspondieron con los aislamientos del electroferogrupos 1 [suave] y dos más que corresponden a las presentadas el aislamiento Nuevo León. Sin embargo, cuando Herrera, *et al.*, (2003) realizaron la secuenciación del gen p23, ubicaron a este aislamiento como variante suave y por PCR detectaron mezclas de variantes tipo severo T36 y variantes suaves tipo T30. Por sintomatología este aislamiento presentó aclaramiento de nervaduras y picado del tallo suave. Por lo tanto, este aislamiento se podría clasificar como tipo severo-moderado.

Para el caso del gen p20, se puede observar mezclas de patrones en los aislamientos Mexicali y Michoacán los cuales presentan patrones SSCP únicos con más de dos bandas, pero diferentes a los otros electroferogrupos lo que sugiere que el RNA genómico de la población de esos aislamientos contiene secuencias variantes a concentraciones detectables. Cabe señalar que con el análisis de este gen se pudieron detectar mezclas para el aislamiento Mexicali, tal como reporta Herrera, *et al.*, (2003), que al realizar secuenciación de los genes CP, p13, P23 y ORF1a además de PCR, encuentran este mismo resultado. El Aislamiento Michoacán, nuevamente presentó más de dos bandas que no se pueden relacionar con ningún otro aislamiento, como en los casos anteriores (gen p13 y p23). La coexistencia de dos variantes en un mismo hospedero no es muy común, por lo que en los patrones SSCP de los 3 genes únicamente con el gen p23, se detectaron 5 mezclas (45.5%) y con los genes P13 y P20 solamente 2 mezclas (18.2%); además la frecuencia de detección de mezclas no es muy alta teniendo en cuenta que únicamente un 10% de la variante mezclada puede ser detectada por esta técnica.

En contraste con lo que reportaron Herrera *et al.*, (2003), al secuenciar la parte central del gen p13, en los aislamientos de Mexicali y Tamaulipas (severos por

sintomatología) indicaron que tienen la misma secuencia; sin embargo, en este estudio se detectó una migración electroforética diferente (con los tres genes evaluados), lo que indica que no son iguales.

Estudios realizados por Rubio, *et al.*, (2001) sugieren que es probable que las mezclas del CTV se presenten con frecuencia en la naturaleza; no obstante las mezclas de aislamientos pueden ser detectadas y estas secuencias podrían estar en altas proporciones. La coexistencia de dos quasispecies (población de las variantes relacionadas genéticamente) en el mismo hospedero no es común, ya que las diferencias en aptitud causarían probablemente el desplazamiento de una de las quasispecies. Estas infecciones mezcladas, grupos tales como Raccach, *et al.*, (1980) y Rubio, *et al.* (2001), las tratan de explicar indicando que son posibles debido a que los hospederos del CTV son perennes (viven por largos periodos de tiempo aproximadamente 100 años), permitiendo la posibilidad de inoculaciones repetidas de áfidos virulíferos y alta diversidad genética. Sin embargo, en México, esto no puede ser, debido a que la dispersión de virus ha sido más por el movimiento de plántulas injertadas con yemas infectadas que por otras vías.

La utilidad de diferenciar variantes de manera rápida podría ser usada para estudios epidemiológicos, como lo sugieren Lee, *et al.*, (1996) y Rubio, *et al.*, (2001); ó evaluación de variantes suaves para protección cruzada (Niblett, *et al.*, 1993; Moreno, *et al.*, 1996) y establecer bases cuarentenarias para prevenir el movimiento de variante severas a nuevas áreas. La Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000. Por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos, contempla la detección del CTV por laboratorios oficiales aprobados por la Dirección General de Sanidad Vegetal, mediante la prueba serológica ELISA, y en casos de dudas mediante PCR para detectar al virus de manera general, debido a que cuando el diagnóstico fitosanitario es negativo, el laboratorio de pruebas expide el dictamen respectivo al interesado, marcando copia a la Dirección General de Sanidad Vegetal.

Sin embargo cuando el resultado es positivo, éste deberá remitirse a la Dirección General de Sanidad Vegetal, para que ésta determine las medidas fitosanitarias aplicables (erradicación de cualquier brote).

Con este estudio, se pueden sugerir que a las muestras positivas, se les realice un análisis de SSCP para determinar la variante que se encuentra en las muestras, de tal manera que las variantes severas o moderadas sean erradicadas y las variantes suaves se mantengan (posible protección cruzada), ya que hasta la fecha del primer reporte del CTV (1983, en que se detectó por primera vez la presencia del CTV en el Estado de Tamaulipas y en 1986 en Veracruz), ambos brotes fueron eliminados oportunamente. En México, no se ha presentado la muerte de árboles de cítricos por infecciones del virus, como lo reportan otros países, lo cual se podría explicar, por la composición de la población viral, ya que los síntomas dependen de ella.

Además, algunos experimentos indican que la transmisión por áfidos puede actuar como un filtro, clasificando algunas variantes genómicas de RNA, dando lugar a una población diferente que puede o no expresar un síntoma. En un estudio realizado por Roistacher & Moreno (1991) se demostró que subvariantes obtenidas de variantes de CTV asintomáticas, pasadas por varias plantas hospedadoras, fueron altamente patogénicas; indicaron también que la frecuencia de los cambios observados en la población fueron por la posibilidad de que los áfidos clasifican y transmiten algunas variantes de mayor importancia patogénica, pudiendo explicar la aparición de aislados virulentos en las áreas donde no habían sido observadas antes. Por lo que con la llegada y capacidad de dispersión del pulgón café de los cítricos *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), -presente en Belice desde 1996, Halbert (1996)- a los estados de Yucatán al sur de Mérida, y Quintana Roo, en abril del 2000, y a otros estados del sureste de México, se emitió un decreto en el diario oficial de la federación el 27 de julio, mediante el cual se instrumenta el "dispositivo nacional de emergencia en los términos del artículo 46 de la Ley Federal de Sanidad Vegetal, con el objeto de confirmar, erradicar y prevenir la dispersión del pulgón café y del CTV, en las zonas del territorio nacional donde se detectó la presencia de esta plaga, con el fin de que

no dispersen más el inóculo ya que el pulgón café es capaz de seleccionar variantes severas del virus (Lee *et al.*, 1992, 1993; Roistacher *et al.*, 1991; Yokomi *et al.*, 1993).

La utilidad de esta técnica es para determinar que tipo de variante del virus está presente en una determinada zona y así prevenir nuevas inoculaciones, por el pulgón ya que el avance del insecto es inminente. Por otro lado, y de acuerdo al programa de reconversión citrícola (Norma Oficial Mexicana NOM-079) que establece requisitos fitosanitarios para producción y movilización del material propagativo libre del VTC y otros patógenos asociados a los cítricos, se podrían establecer medidas para tener plantas, en algunos de los casos, preinmunizadas con variantes suaves del virus para evaluar la estabilidad de los complejos suaves y apoyar en el manejo de este complejo de variantes del virus.

VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, se concluye lo siguiente:

1. La sintomatología producida por el CTV en diferentes injertos utilizando como patrón a Lima Mexicana (*Citrus aurantifolia*) fueron: aclaramiento de nervaduras en los aislamientos de Veracruz, Q. Roo, Yucatán y Colima; aclaración de nervaduras y acanaladura de rama en los aislamientos de Michoacán y Nuevo León; y acanaladura de rama (marcada) y picado de tallo en los aislamientos provenientes de Mexicali y Tamaulipas.
2. La técnica de SSCP demostró ser una alternativa útil para conocer la variación existente dentro de los aislamientos mexicanos del CTV en los genes p13, p20 y p23; permitiendo discriminar de cuatro a cinco electroferogrupos que fueron: Electroferogrupo 1, distintivo de las variantes suaves (aislamientos Jalisco, Chetumal, Nayarit, Veracruz, Colima y Yucatán); Electroferogrupo 2 y 3, distintivos de las variantes severas (Baja California Norte y Tamaulipas respectivamente); Electroferogrupo 4, variantes moderadas (Michoacán y Nuevo León) y Electroferogrupo 5, patrón característico de la variante moderada (Nuevo León) este último con base en el análisis del gen p20.
3. Los patrones SSCP generados a partir del análisis del gen p23 permitieron detectar mezclas en los aislamientos de Jalisco, Q. Roo, Veracruz, Mexicali, Tamaulipas y Michoacán.
4. De acuerdo a las variables evaluadas en las plantas indicadoras, análisis SSCP y comparación con las secuencias generadas por Herrera *et al.*, (2003), los aislamientos Q. Roo, Veracruz, Colima y Yucatán se ubicaron como aislamientos suaves, mientras que los aislamientos Tamaulipas y Mexicali se ubicaron como variantes severas.

VII. LITERATURA CITADA

Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Hermoso de Mendoza, A., Laigret, F., Ballester-Olmos, J.F., and Moreno, P. 1999. Aphid Transmission alters the genomic and defective RNA populations of citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 90:134-138.

Anonimo a. 1993. Manejo de la tristeza de los cítricos en México. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia de Diagnóstico Fitosanitario. México, D.F.

Anonimo. 1993. Virus tristeza de los cítricos. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos . Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. Centro de Investigación Regional del Golfo Centro .Campo experimental Cotaxtla. Folleto Técnico Núm. 5.

Anonimo. 2001. Detección e Identificación de Fitopatógenos de Importancia Cuarentenaria. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Memorias.

Ayllon, M.A., Lopez, C., Navas-Castillo, J., Mawassi, M., Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P. 1999. New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase-driven template switching mechanism in their generation. *J. Gen. Virol.* 80, 817-821.

Ayllón, M.A. 2001. *Arch Virol* 146:27-40.

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

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

Bar-Joseph, M. and Loebenstein, G. 1973. Effects of strain, source plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology.* 63 : 716-720.

- Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves, M. Moscovitz, D. Purcifull, m. F. Clark y G.** 1979. Lobenstein. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*. 69 (20): 190-194.
- Berlansky, R.H., Lee, R.F. and Garnsey, S.M.** (1988). In situ immunofluorescence for the detection of citrus tristeza virus inclusion bodies. *Plant Disease* 72:820-826.
- Brlansky, H.R. and Lee, R.F.** 1990. Numbers of inclusions bodies produced by mild and severe strains of citrus tristeza virus in seven citrus host. *Plant Disease* 74:297-299.
- Cambra, M., Serra-Arcil, J., Bonet-Martínez, J. And Villalba-Buendía, D.** 1991. Situación de la tristeza de los cítricos en la Comunidad Valenciana. Generalitat Valenciana. Conselleria D'Agricultura i Pesca. Instituto Valenciano de Investigaciones agrarias. Valencia (Moncada), España. 32p.
- Clarke, B.C., Maran, L.B. and Apples, R.** 1989 DNA analyses in wheat breeding. *Genetics*, 86, 694-698.
- Cruz, F.M. y G. A. Frías T.** 1997. Guía ilustrada de la Prueba de Inmunoadsorción con enzimas ligadas para la detección de fitopatógenos. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Dirección General de Sanidad Vegetal.
- Curti,-Diaz, S.A., Loredó-Salazar, X., Díaz-Zorrilla, U., Sandoval, R.J.A., Hernandez, H. J.** 2000. Tecnología para producir limón persa. INIFAP-CIRGOC. Campo experimental Ixtacuaco. Libro Técnico Núm. 8. Veracruz, México. 144p.
- Christie, R.G. and Edwarson J.R.** 1977. Light and electron microscopy of plant virus inclusions. Florida Agricultural Experimental Stations. Monog. Ser. 9 150 pp.
- Dodds, J.A., Jordan, R.J., Roistacher, C.N., Jarupat, T.** 1987. Diversity of citrus tristeza virus isolates indicated by dsRNA analysis. *Intervirology* 27, 177-188.
- Dolja, V.V. & Carrington, J.C.** 1992. Evolution of positive strand RNA viruses. *Seminars in Virology* 3:315-326.
- Domingo, E. & Holland, J.J.** 1994. Mutación rates and rapid evolution of RNA viruses. In the *Evolutionary Biology of Viruses*, Edited by Morse, S.S. New York: Raven Press. 161-184 pp.
- dUrso, F., Ayllón, M.A., Rubio, L., Sambade, A., Hermoso de mendoza, A., Guerri, J. And Moreno, P.** 2000. Contribution of uneven distribution of genomic

RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* 49:288-294.

Edwarson, J.R. and Christie R.G. 1978. Use of virus induced inclusions in classification and diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 16:31-55.

Febres, V.J 1995. Molecular characterization of citrus tristeza virus genes and their use in plan transformation, Ph. D. Thesis. University of Florida, Gainesville, FL.

Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A. Bar-Joseph, M., Lee, R.F. and Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.

Febres, V.J., Pappu, H.R., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Lee, R.F. and Niblett, C.L. 1994. The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed *in vivo*. *Virology* 201:178-181.

Gago-Zachert, S.P., Costa, N. B., Semorile, L., Grau, O. 1999. Sequence variability in p27 gene of citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis. *EJB Electronic Journal of Biotechnology*: ISSN: 0717-3458. Vol. 2. No. 1. 41-50.

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

Garnsey, S. M., Barrett, H. C., and Hutchinson, D. J. 1987. Identification of citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19:187-191.

Garnsey, S. M., Civerolo, E. L., Gumpf, D.J., Yokomi, R. K., Lee, R. F. 1991. Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. Pages 1 13-120 in: *Proc. Intl. Org. Citrus Virology*, 1 lth. R. H. Brlansky, R. F. Lee, and L.W. Timmer, eds. Riverside, California.

Garnsey, S. M., Christie, R.G., Derrick, K.S. and Bar-Joseph, M. 1980. Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. In proceedings of the eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). Calavan, E.W., Garnsey, S.M. and Timmer, L.W. (eds.). Riverside. 9-16 pp.

Garnsey, S. M., Gonsalves, D., Purcifull, D.E. 1979. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus by SDS-immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 69, 88-95

- Garnsey, S. M., Kano, T., Permar, T.A., Cambra, M., Koizumi, M. And Vela, C.** 1989. Epitope diversity among citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 79:1174.
- Gibbs, M.** 1995. The luteovirus supergroup: rampant recombination and persistent partnerships. In *Molecular Basis of virus evolution*. Edited by Gibbs, A.J., Calisher, C.H., & Garcia-Arenal, F. Cambridge: Cambridge University Press. 351-368.
- Gillings, M., Broadbent, P., Indsto, J., Lee, R.F.,** 1993. Characterization of isolates and strains of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods.* 44, 305-317.
- Gottwald, T.R.** 1992. CTV epidemiology and disease survey strategies. Pag. 106-109, en : *Citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of management strategies and use of biotechnology for control. Proceedings of a Workshop. CATIE-University of Florida-INIFAP/SARH-Universidad Central de Venezuela-USDA. September 15-19. Maracay, Venezuela.*
- Hayashi, K.** (1991). PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods and Applications* 1:34-38.
- Henry, R.J.** 1997. *Molecular and applications of plant molecular biology* Great Britain by Cambridge University Press. 258 pp.
- Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J. and Dawson, W.O.** (1995) Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- Kitajima, E.W. and Costa, A.S.** 1968. Electron microscopy of the tristeza virus in citrus leaves. In *proceedings of the fourth conference of the international organization of citrus virologist. (IOCV)*. Childs, J.F.L. (ed.) Gainesville, University of Florida Press. Pp. 59-64.
- Kitajima, E.W., Silva, A.R., Oliviera, G.M., Müller, G.M. and Costa, A.S.** 1964. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature* 201:1011-1012.
- Kohler, G., ADN C. Milstein.** 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.

- Koonin, E.V. & Dolja, V.V.** 1993. Evolution and taxonomy of positive strand RNA viruses: Implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28:375-430.
- Kurt, W., Hide, N., Kirsten, W. And Wieland, M.** 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton, Florida. 321 pp.
- Lastra, R., Lee, R., Rocha-Peila, M., Niblett, C. L., Ochoa, F., Garnsey, S. M., and Yokomi, R. K., eds.** 1992. Citrus tristeza virus and *Toxoptera citricidus* in Central America: Development of management strategies and use of biotechnology for control. Proc. Workshop, CATIE-University of Florida-INIFAP/ SARH-Universidad Central de Venezuela-USDA, Maracay, Venezuela.
- Lastra, R., Meneses, R., Still, P. E., and Niblett, C. L.** 1991. The citrus tristeza virus situation in Central America. Pages 156-159 in: Proc. Conf. Intl. Org. Citrus Virol., 11th. R. H. Brlansky, R. F. Lee, and L.W. Timmer, eds. Riverside, California.
- Lee, R. F., and Rocha-Peña, M. A.** 1992. Citrus Tristeza Virus. Pages 226-249 in: Plant Diseases of International Importance III. A. N. Mukhapadhyay, H. S. Chaube, J. Kumar, and U. S. Singh, eds. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Lee, R. F., Baker, P. S., and Rocha-Peña, M.A.** 1994. Citrus tristeza virus (CTV): An introduction to current priorities, with special reference to the worsening situation in Central America and the Caribbean, International Institute of Biological Control, Centre for Agriculture and BioSciences (CAB) Internacional, and Food and Agriculture Organization (FAO), United Kingdom.
- Lee, R.F. , Derrick, K.S. & Niblet, C. L.** 1993. A survey of Cuba for citrus tristeza virus, the brown citrus aphid and citrus blight. September 1-20, 25 pp. University of Florida, Gainesville.
- Lee, R.F.** 1984. Use of double strand RNAs to diagnose strains of citrus tristeza virus. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 97, 53-56.
- Lee, R.F., Pappu, H.R. Pappu, S.S., Rocha-Peña, M.A., Febres, V.J., Manjunath, K.L., Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Cevik, B., Akbulut, M., Benscher, D., Anderson, E.J., Price, M., and Niblett.** 1996. Progress on strain differentiation of citrus tristeza virus. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 14:79-87.

- Levesque, C. A.** 1997. Molecular detection tools in integrated disease management: Overcoming current limitations. *Phytoparasitica* 25:3-7.
- Martin, R. R., D. James, ADN C. A. Levesque.** 2000. Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annu. Rev. Phytopathol* 38:207-239.
- Mawassi, M., Gafney, R., Bar-Joseph, M.** 1993. Nuclotide sequences of the coat protein gene of citrus tristeza virus: comparison of biologically diverse isolates collected in Israel. *Virus Genes* 7, 265-275.
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G. & Bar-Joseph, M.** (1996). Unusual sequence relationships between two isolates of citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 77:2359-2364.
- McWorter, F.P.** 1965. Plant virus inclusions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3:287-312.
- Moreno, P.** 1996. Diagnóstico de virosis: Técnicas clásicas. Llácer, G. López, M.M. Traperó, A. y Bello, A. (eds.), *Patología Vegetal*. S.E.F., Madrid.
- Moreno, P., Guerri, J. and Muñoz, N.** 1990. Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNAs). *Phytopathology* 80:477-482.
- Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J. F., Fuertes-Polo, C., Albiach, R. and Martínez, M.E.** 1993. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology* 42: 35-41.
- Moreno, P., Guerri, J., Ballester-Olmos, J.F., and Martínez, M.E.** 1991. Segregation of citrus tristeza virus as evidenced by double strand RNA (dsRNA) analysis. Pag. 20-24, in: Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Navarro, L. (ed). *Proc. 19th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California.
- Moreno, P.J., Guerri, and Muñoz, N.** 1990. Identification of Spanish strains of citrus tristeza virus (CTV) by analysis of double-stranded RNAs (dsRNA). *Phytopathology* 80:477-482.
- Niblet, C.L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G, Bonacalza, B., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Pappu, H.R., Lee, R.F.** 2000. Progress on strain

differentiation of citrus tristeza virus and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. *Virus Research* 71: 97-160

Niblett, C.L., Pappu, H.R., Pappu, S.S., Lastra, R.J. and Lee, R.F. 1993. Amplification of the coat protein gene of citrus tristeza virus from *Toxoptera citricida*, its aphid vector. *Phytopathology* 83: 1375 (Abstr.).

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms. *Genomics* 5:874-879.

Palacios, J. 1978. *Citricultura moderna*. ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

Pappu, H. R., Pappu, S. S., Manjunath, K. L., Lee, R. F., and Niblett, C. L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90:3641-3644.

Pappu, H.R. Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolia, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F. and Niblett, C.L. (1994) Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199:35-46.

Peña del Río, M.A. 1987. Afidofauna asociada al el cultivo de los cítricos en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosi y Veracruz. Informe de Labores. CEGET-INIFAP-SARH.

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.

Purseglove, J.W. 1974. *Tropical crops. Dicotyledons*. Longman. London. pp 493-522.

Raccah, B., Bar-Joseph, M. and Loebenstein, G. 1980. Aphid-transmissibility of citrus tristeza virus in infected trees. *Phytopathology* 70:1173-1178.

Raccah, B., Roistacher, C. N., and Barbagallo, S. 1989. Semipersistent transmission of viruses by vectors with special emphasis on citrus tristeza virus. *Adv. Dis. Vector Res.* 6: 301-340.

Rocha-Peña, M. A., Peña del Río, M. A., and y Lee, R. F. 1992. El virus de la tristeza y sus insectos vectores: amenaza potencial para la citricultura de México.

Publicación Especial No. 1. INIFAP/ SARH, Campo Experimental General Terán, México.

Rocha-Peña, M.A. 1994. Metodología de muestreo, colecta y envío de muestras de cítricos para la detección del virus de la tristeza. INIFAP/SARH. Campo experimental General Terán. México.

Rocha-Peña, M.A., Lee, R.L. , Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M. Yokomi, R.K. & Garnsey S.M. 1995. Citrus Tristeza Virus and Its Aphid Vector *Toxoptera citricida*. Plant Disease: 79(5):437-445.

Roistacher, C. N. 1981. A blueprint for disaster. Part 2: Changes in transmissibility of seedling yellows. Calif. Citrograph 67:28-32.

Roistacher, C. N. and Bar-Joseph, M. 1987. Aphid transmission of citrus tristeza virus: A review. Phytophylactica 19:163-167.

Roistacher, C. N., and Bar-Joseph, M. 1987. Aphid transmission of citrus tristeza virus: A review. Phytophylactica 19:163-167.

Roistacher, C. N., Gumpf, D. J., Dodds, J.A., and Lee, R. F. 1991. The threat of "The citrus killer." Calif. Citrogr. Vol. 76(10):4,5,8-12.

Roossinck, M.J. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. Annual Review of Phytopathology. 35, 191-209.

Rubio, L., Ayllon, M.A., Kong, P., Fernández, A. Polek, M., Guerri, J., Moreno, P., and Falk, B.W. 2001. Genetic variation of citrus tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for Mixed Infections and recombination. Journal of Virology, 75:8054-8062.

Rubio, L., Guerri, J. and Moreno, P. 2000. Characterization of citrus tristeza virus isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of DNA complementary to their RNA population. Fourteenth IOCV Conference 12-17pp.

Rubio, L., Ayllón, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C.N. and Moreno, P. 1996. Differentiation of citrus tristeza (CTV) isolates by single-strand conformation polymorphism analysis of the coat protein gene. Annals of Applied Biology 129:479-489.

Sambrook, J.E.F., Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual 2a. de vols. I,II y III.

- Sasaki, A., Tsuchizaki, T., and Saito, Y.** 1980. Distribution of tristeza virus antigen in citrus tissues. In proceedings of the eighth conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). Calavan, E.C., Garnsey, S.M. and Timmer, L.W. (eds.). Riverside. 17-19 pp.
- Schneider, H.** 1957^a. Chromatic parenchyma cells in tristeza-diseased citrus. *Phytopathology* 47:533 (Abstract)
- Schneider, H.** 1957^b. Anatomical response of some citrus species to tristeza virus.. *Phytopathology* 47:534 (Abstract)
- Schneider, H.** 1959. The anatomy of tristeza virus infected citrus. In proceedings of the conference of citrus virus diseases. Wallace, J.M. (ed.) Berkeley. Univ. California, Division of Agricultural Sciences. 73-84 pp.
- Souza, A.A., Carvalho, S.A., Targon, M.L.P.N., Müller, G.W., and Machado, M.A.** 2000. Characterization of citrus tristeza virus isolates by SSCP of the Coat Protein Gene in initially healthy sweet orange varieties after three years of field exposure. Fourteenth IOCV Conference, 131-134.
- Thomson, D. and Henry, R.** 1993. Use of DNA from dry leaves for PCR and RAPD analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11, 202-206.
- Tsuchizaki, T., Sasaki, A., and Saito, Y.** 1978. Purification of citrus tristeza virus from diseased citrus fruits and the detection of the virus in citrus tissues by fluorescent antibody techniques. *Phytopathology* 68:139-142.
- Valadez, M.E., Kahl, G.** 2000. Huellas de ADN de genomas de plantas (teoría y Protocolos de Laboratorio). Mundi-Prensa México, 147p.
- Van Vuuren, S.P., Collins, R.P. and de Graça, J.V.** (1993). Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South-Africa. *Plant Disease* 77: 24-28.
- Vela, C., Cambra, M., Cortes, E., Moreno, P., Miguët, J., Perez de San Roman, C., Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *J. Gen. Virol.* 67, 91-96.
- Vives, M.C., Rubio, L., Lopez, C. Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R. Dawson, W.O., Guerri, J., Flores, R., & Moreno P.** (1999). The complete genome sequence

of the major component of a mild citrus tristeza virus isolate. J. Gen. Virol. 80:811-816.

Xie, J., Wehner, T.C. and Conkling, M. A. (2002). PCR-based Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) Analysis to Clone Nine Aquaporin Genes in Cucumber. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 127(6):925-930

Yokomi, R. K. and Garnsey, S. M. 1987. Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* and *Aphis citricola* in Florida. Phytophylactica. 19:169-172.

Yokomi, R. K. and Oldfield, G.N. 1991. Seasonal fluctuations of alate aphid activity in California citrus groves. 71-76, en : Brlansk, R.H., Lee, R.F., and Timmer, L.W. (ed). Proc. 11th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol. Riverside, California

Yokomi, R. K., Lastra, R., Stoetzel, M. B., Damsteegt, V. D, Lee, R. F., Garnsey, M., Gottwald, T. R., Rocha-Pefia, M. A., and Niblett, C. N. 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. J. Econ. Entomol. 87:1078-1085.