

DETECTION OF *Citrus sudden death-associated virus* AND HAPLOTYPES OF *Citrus tristeza virus* IN *Toxoptera citricida* AND *Aphis spiraecola* AND IMPLICATION ON CITRUS SUDDEN DEATH IN BRAZIL

DETECCIÓN DEL *Citrus sudden death-associated virus* Y HAPLOTIPOS DEL *Citrus tristeza virus* EN *Toxoptera citricida* Y *Aphis spiraecola* E IMPLICACIONES EN LA MUERTE SÚBITA DE LOS CÍTRICOS EN BRASIL

Emiliano Loeza-Kuk¹, Daniel L. Ochoa-Martínez¹, Gustavo Mora-Aguilera^{1*}, Patricia Rivas-Valencia¹, M. Alejandra Gutiérrez-Espinosa², Waldir Cintra de Jesús Junior³, Ángel Villegas-Monter², Nelson Arno-Wulff⁴ and Eugenio Perez-Molphe-Balch⁵

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

ABSTRACT

Individuals of *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) and *Aphis spiraecola* (Patch) collected in 16 commercial citrus orchards of the São Paulo and Minas Gerais States of Brazil were analyzed for virus presence. Orchards of Minas Gerais were selected because citrus trees exhibit symptoms of citrus sudden death (CSD) and in São Paulo due the presence of severe strains of *Citrus tristeza virus* (CTV), in order to detect genomic sequences of any of these strains that could be associated to CSD. Samples made up of 20 aphids from the localities of Comendador Gomes, Frutal, Prata and Uberlândia, in the State of Minas Gerais, a CSD associated virus (CSDaV) was often found through nested RT-PCR; in samples from São Paulo, none showed positive for the same primers. With the aim to find relationships between the presence of a specific strain of CTV and the expression of CSD, specific probes were used for sequences associated to severity of isolates. The results were negative and the most promising option was to detect CTV sequence variants acquired by aphids through SSCP, to determine if there was a preference for any of the variants. No CTV sequence variants exclusive to trees with CSD symptoms were detected in aphids, but CTV was more prevalent than CSDaV in both aphid species (98 and 90% vs. 42 and 10%). Results confirm the presence of CSDaV in aphids colonizing trees with or without CSD symptoms. However, detection of CSDaV was more frequent under the CSD condition and five times higher in *T. citricida*.

Key words: Aphids, virus detection, *Citrus tristeza virus*, *Citrus sudden death-associated virus*.

INTRODUCTION

In 1999 a new disease causing the accelerated collapse of the affected plants appeared in some citrus producing areas of Brazil being named citrus

RESUMEN

Se analizaron individuos de *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) y *Aphis spiraecola* (Patch) recolectados en 16 huertas comerciales de cítricos en los Estados de São Paulo y Minas Gerais, para evaluar la presencia de virus. Las huertas de Minas Gerais se seleccionaron debido a que los árboles de cítricos exhibían síntomas de muerte súbita de los cítricos (MSC) y en São Paulo debido a la presencia de variantes severas del *Citrus tristeza virus* (CTV), que pudieran permitir detectar secuencias genómicas de cualquiera de estas variantes en asociación con MSC. En grupos muestrales de 20 áfidos, provenientes de las localidades de Comendador Gomes, Frutal, Prata y Uberlândia, del Estado de Minas Gerais, se encontró con frecuencia un CSD associated virus (CSDaV) mediante el uso de RT-PCR y PCR anidado; en muestras de São Paulo, ninguna fue positiva para los mismos iniciadores. Con el objetivo de encontrar relación entre la presencia de una variante específica de CTV y la expresión de MSC, se usaron sondas específicas para secuencias asociadas a la severidad de los aislamientos. Los resultados fueron negativos y la opción más viable fue detectar variantes de secuencias de CTV adquiridas por áfidos a través de SSCP para determinar si existió preferencia por alguna de las variantes. No se detectaron en áfidos variantes de secuencias de CTV exclusivas a árboles con síntomas de MSC, pero el CTV fue más común que el CSDaV en ambas especies de áfidos (98 y 90% vs. 42 y 10%). Los resultados confirman la presencia del CSDaV en áfidos que colonizaron árboles con o sin síntomas de MSC. Sin embargo, la detección del CSDaV fue más frecuente en la condición de MSC y cinco veces mayor en *T. citricida*.

Palabras clave: Áfidos, detección viral, *Citrus tristeza virus*, *Citrus sudden death-associated virus*.

INTRODUCCIÓN

En 1999 se detectó en ciertas áreas cítricas de Brasil una nueva enfermedad que causa el colapso acelerado de las plantas afectadas, la cual

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: November, 2007. Aproved: June, 2008.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 42: 669-678. 2008.

sudden death (CSD). Although etiology of the disease is unknown, Roman *et al.* (2004) reported that it is transmitted by grafting and that fungi, viroids, and endogen bacteria were not the causal agents.

CSD shares several common aspects with the disease caused by *Citrus tristeza virus* (CTV), such as deterioration at the bud union of the graft, fast decline, and temporal and spatial epidemiological parameters (Bassanezi *et al.*, 2003). For these reasons it was proposed that CSD was caused by a new strain of CTV. This strain would have broken the effect conferred by the use of CTV tolerant rootstocks and cross protection, which has been extensively used in Brazil (Müller and Costa, 1977; Müller *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004). Spatial and temporal epidemiological analysis of CSD progress indicates that its spreading could be associated with a winged vector, such as an aphid (Bassanezi *et al.*, 2003). This would be in agreement with the hypothesis that CSD is caused by a mutant of CTV. Certain severe CTV isolates are acquired and transmitted at higher rates by its aphid vectors (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Bransky *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). However, no particular CTV isolate has been directly implicated in CSD after extensive molecular analysis using plant tissue (Targon *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004; Rivas-Valencia *et al.*, 2008). A second hypothesis about the etiology of CSD has implicated a marafivirus named *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV). This virus has been consistently found in samples but in areas free of the disease (Macherroni *et al.*, 2005). Due to the fact that it is a fast spreading disease (Bassanezi *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004), a highly effective vector should be involved. In addition, virus detection on aphid vectors may narrow than the number of haplotypes being actively moved on the field, opening another approach to study a possible association of CTV with CSD.

The objective of this study was to determine if the population of CTV haplotypes detected in *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola* from regions affected with CSD differs from those found in CSD free regions, in order to provide evidence of CTV association with CSD as well as to relate the detection of CSDaV with aphid species and structure of CTV haplotypes.

MATERIALS AND METHODS

Aphid sampling

The collections were done in September and October of 2005, in sixteen sites of citrus regions of the States of Minas Gerais and São Paulo, Brazil (Table 1). Groups of 50-100 aphids colonizing citrus shoots were collected, and kept in alcohol 70%. Two species

se denominó muerte súbita de cítricos (MSC). Aunque la etiología de la enfermedad se desconoce, Roman *et al.* (2004) reportaron que se transmite por injerto y que hongos, viroides o bacterias endógenas no son agentes causales.

La MSC comparte varios aspectos con la enfermedad causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV), como son daño en la unión del injerto, rápido declinamiento y parámetros epidemiológicos temporales y espaciales (Bassanezi *et al.*, 2003). Por estas razones, se propuso que la MSC era causada por una nueva variante de CTV. Esta variante pudo haber roto el efecto conferido por el uso de portainjertos tolerantes al CTV y a la protección cruzada, que han sido usadas ampliamente en Brasil (Müller y Costa, 1977; Müller *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004). El análisis espacial y temporal del progreso de la MSC indica que su dispersión podría estar asociada con un vector alado, que podría ser un áfido (Bassanezi *et al.*, 2003). Esto soporta la hipótesis de que la MSC es causada por una variante mutada del CTV. Ciertas variantes severas de CTV se adquieren y transmiten en tasas mayores por sus áfidos vectores (Ballester-Olmos *et al.*, 1993; Bransky *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005). Sin embargo, no se ha encontrado implicación de aislamientos específicos de CTV en la MSC después de análisis moleculares extensivos usando tejido vegetal (Targon *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004; Rivas-Valencia *et al.*, 2008). Una segunda hipótesis sobre la etiología de la MSC implica un marafivirus llamado *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV). Este virus se ha encontrado consistentemente en muestras vegetales excepto en áreas libres de la enfermedad (Macherroni *et al.*, 2005). Debido al hecho de que es una enfermedad de dispersión rápida (Bassanezi *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004), estaría involucrado un vector altamente eficaz. Además, la detección de virus en áfidos vectores puede reducir el número de haplotipos que se mueven activamente en el campo, abriendo otro enfoque para estudiar una posible asociación del CTV con la MSC.

El objetivo de este estudio fue determinar si la población de haplotipos de CTV detectados en *Toxoptera citricida* y *Aphis spiraecola*, obtenidos de regiones afectadas por la MSC difieren de aquellos encontrados en regiones libres de MSC con el fin de proporcionar evidencia de la asociación del CTV con la MSC, y para relacionar la detección del CSDaV con especies de áfidos y la estructura de haplotipos de CTV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de áfidos

Las recolectas se realizaron en septiembre y octubre de 2005, en 16 sitios de regiones citrícolas en los Estados de Minas Gerais

were collected separately, *T. citricida* and *A. spiraeicola* based on visual characteristics further confirmed in the laboratory (Stoetzel, 1994). In orchards where insecticides prevented aphid colonization, individuals were taken from peripheral orchards with the same attribute regarding CSD.

Total RNA extraction

For the extraction of RNA, 20 wingless adult aphids were taken, removing the alcohol and macerating them with a pistil in sterile microcentrifuge tubes with 100 μ L CTAB 2% (NaCl 1.4M, Tris-HCl 0.1M pH 8.0) buffer, and were kept in cold conditions (Freitas-Astúa *et al.*, 2003). After maceration, 500 μ L of CTAB 2%+0.5% de β -mercaptoethanol buffer prepared with DEPC water was added, mixed in vortex, and incubated at 55 °C for 20 min. Then 400 μ L chloroform:isoamyl alcohol 24:1 were added, mixed in vortex, and centrifuged at 12 000 rpm for 10 min at 4 °C. From the water phase 400 μ L were taken and transferred to a sterile microcentrifuge tube where another 400 μ L of 24:1 chloroform: isoamyl alcohol were added. From the upper phase 400 μ L were taken, transferred to a new microcentrifuge tube, added 1/10 volume of ammonium acetate (40 μ L), one volume of isopropyl alcohol (400 μ L) and precipitated at -20 °C for 15 min. Afterwards, it was centrifuged at 12 000 rpm for 5 min, the upper phase was discarded, the pellet was washed with 1 mL ethanol 70% prepared

y São Paulo, Brasil (Cuadro 1). Grupos de 50-100 áfidos colonizando brotes de cítricos se recolectaron y mantuvieron en alcohol al 70%. Dos especies se recolectaron por separado, *T. citricida* y *A. spiraeicola*, con base en características visuales confirmadas en el laboratorio (Stoetzel, 1994). En huertas donde el uso de insecticidas previno la colonización por áfidos, se tomaron individuos de las huertas aledañas con los mismos atributos en cuanto a MSC.

Extracción total de ARN

Para la extracción de ARN, se tomaron 20 áfidos adultos sin alas, eliminando el alcohol y macerándolos con un pistilo en tubos de microcentrífuga estériles con 100 μ L CTAB 2% (NaCl 1.4M, Tris-HCl 0.1M pH 8.0) de amortiguador, y se conservaron en frío (Freitas-Astúa *et al.*, 2003). Después de la maceración, se añadieron 500 μ L de amortiguador CTAB 2%+0.5% de β -mercaptoetanol preparado con agua DEPC, se mezclaron en vórtex e incubaron a 55 °C por 20 min. Después, se añadieron 400 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se mezclaron en vórtex y centrifugaron a 12 000 rpm por 10 min a 4 °C. De la fase acuosa, se tomaron 400 μ L y transfirieron a un tubo estéril de microcentrífuga donde se añadieron otros 400 μ L de 24:1 cloroformo:alcohol isoamílico. De la fase superior se tomaron 400 μ L, se transfirieron a un nuevo tubo de microcentrífuga, se añadió 1/10 del volumen de acetato de amonio (40 μ L), un volumen de alcohol isopropil (400 μ L), y se precipitó a -20 °C por 15 min. Luego, se centrifugó a 12 000 rpm por 5 min, se descartó la fase superior, se lavó el pellet con 1 mL etanol al 70% preparado con agua DEPC, y se centrifugó a 12 000 rpm por 1 min. Después de la centrifugación, el líquido se eliminó de los tubos los cuales se secaron a temperatura ambiente y los pellets se suspendieron en 30 μ L agua DEPC. La calidad y cantidad de ARN obtenido se corroboró en gel de agarosa al 1%.

RT-PCR y PCR anidado para la detección de virus en áfidos

Para detectar CTV y CSDaV en áfidos, se efectuó RT-PCR de un paso con los iniciadores CN119 y CN120 flanqueando el gene de la proteína p25 del CTV (Cevik *et al.*, 1996b), así como los iniciadores CSDaV-F (Alellix Applied Genomics) y CSDaV-R (FUNDECITRUS A. C.), para detectar CSDaV (Cuadro 2). La mezcla reactiva consistió de 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1 ng de cada iniciador, 10 U RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 25 U MMLV reverse transcriptasa (Invitrogen) y 0.75 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen).

De la mezcla reactiva se tomaron 20 μ L y se añadieron a 5 μ L del ARN total, desnaturalizado a 70 °C por 5 min para un volumen total de 25 μ L. El programa para el RT-PCR fue: 60 min de retrotranscripción a 42 °C, 2 min a 94 °C para la desactivación de RT, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C para el CTV. En el caso

Table 1. Citrus orchards sampled for aphids and their status of citrus sudden death in Brazil. October 2005.

Cuadro 1. Huertas de cítricos muestreadas para áfidos y estatus de muerte súbita de cítricos en Brasil. Octubre, 2005.

Location	Orchard	Samples
With presence of CSD		
Comendador Gomes (CG), MG [†]	CG1	3
	CG2	8
	CG3	1
Frutal (FR), MG	FR1	19
	FR2	4
	FR3	2
	FR4	2
	FR5	3
	FR6	1
Prata (PR), MG	PR1	11
	PR2	2
	PR3	1
Uberlândia (UB), MG	UB1	12
Without presence of CSD and CTV-mild isolates		
Botucatu (BT), SP	BT	6
Without presence of CSD and CTV-severe isolates		
Capela do Alto (CA), SP	CA	6
Capão Bonito (CB),SP	CB	5

[†] SP: São Paulo, Brazil; MG: Minas Gerais, Brazil.

with DEPC water, and centrifuged at 12 000 rpm for 1 min. After centrifugation, the liquid was removed from the tubes and dried at room temperature and the pellets were suspended in 30 μ L DEPC water. The quality and quantity of RNA obtained were corroborated in agarose gel at 1%.

RT-PCR and nested PCR for virus detection in aphids

For detection of CTV and CSDaV in aphids, one step RT-PCR was done with primers CN119 and CN120 flanking the gene of protein p25 of CTV (Cevik *et al.*, 1996b), as well as the primers CSDaV-F (Alellix Applied Genomics) and CSDaV-R (FUNDECITRUS A. C.) for the detection of CSDaV (Table 2). The reaction mixture consisted of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 1 ng of each primer, 10 U RNaseOUT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 25 U MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) and 0.75 U Taq DNA polymerase (Invitrogen).

From the reaction mixture, 20 μ L were taken and added to 5 μ L of total RNA, denatured at 70 °C for 5 min for a total volume of 25 μ L. The program for the RT-PCR was: 60 min of reverse transcription at 42 °C, 2 min at 94 °C for RT inactivation, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C and a final extension of 5 min at 72 °C for CTV. In the case of CSDaV, 35 cycles of 30 sec at 94 °C, 1 min at 55 °C, and 3 min at 72 °C and a final extension of 10 min at 72 °C.

The RT-PCR product of both reactions (p25 of CTV and RdRp of CSDaV) was used to carry out a second amplification using the internal primers for each amplified sequence CPK for CTV (Kong

del CSDaV, 35 ciclos de 30 seg a 94 °C, 1 min a 55 °C, y 3 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto RT-PCR de ambas reacciones (p25 de CTV y RdRp de CSDaV) se usó para realizar una segunda amplificación usando los iniciadores internos para cada secuencia CPK amplificada para el CTV (Kong *et al.*, 2000); el C54 y el C1 para variantes genómicas de CSDaV, ambas proporcionadas por T. Nagata (Universidade Católica de Brasília, Brazil).

La mezcla reactiva consistió de 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTPs, 100 μ M de cada iniciador y 0.6 U Taq pol (Invitrogen). El PCR comenzó con una desnaturalización a 94 °C por 2 min. Le siguieron 35 ciclos de amplificación de 94 °C por 30 s. (T_m=50 °C para CTV y C54, 55 °C para C1) por 30 s y 72 °C por 30 s, seguidos de una extensión final de 72 °C por 5 min. Para las reacciones, el testigo absoluto negativo fue agua estéril, y como testigo positivo se usaron viriones purificados por gradientes de densidad tomados de tejido de árboles infectados con síntomas de CSD y CTV.

Detección de variantes genómicas de CTV y CSDaV adquiridos por áfidos a través de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP)

La identificación de patrones de SSCP se realizó a partir del producto CPK, según lo reportaron Sambade *et al.* (2002). Las cadenas se separaron en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 12% en un voltaje constante de 200 V por 2.5 h. Los geles se visualizaron usando un tinte con nitrato de plata (Beidler *et al.*, 1982).

Table 2. Specific primers used to detect *Citrus tristeza virus* (CTV) and variants of *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) in adults of *T. citricida* and *A. spiraeola*.

Cuadro 2. Iniciadores específicos usados para detectar el *Citrus tristeza virus* (CTV) y variantes del *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) en adultos de *T. citricida* y *A. spiraeola*.

Primer	Sequence (5' a 3')	Region	Size [†] (bp)
CN119-F [¶] CN120-R	AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG ^{††} GAATTCGCGGCCGCTCAACGTGTGTTAAATTTCC [□]	CTV p25	703
CPK-F CPK-R	AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC	CTV p25	276
CSDaV-F [§] CSDaV-R	ACCTTCCAGGAACCTTAAGGTGGC GTGAGGATGGGAGCAGAGGAAC	CSDaV-RdRp	2598
C54-F [¶] C54-R	AACCTACCACCTGCCATCCTGA GCATTCGGTAAACAGCACAAAGC	RdRp-C54	366
C1-F [¶] C1-R	CCGCTGTCAACCATTGCTTCCAG AGATGGGATGTCCCGGTGAAGG	RdRp-C1	469

[†] Expected size (nt) of the RT-PCR products ♦ Tamaño esperado (nt) de los productos de RT-PCR.

[¶] Primers used. F is for primers complementary to the negative strand and R for those complementary to the positive strand ♦ Iniciadores usados. F es para los iniciadores complementarios a la cadena negativa y R para aquellos complementarios a la cadena positiva.

[§] Primers used in amplification of RdRp region of CSDaV ♦ Iniciadores usados en la amplificación de la región RdRp del CSDaV.

[¶] Specific primers for C54 and C1 variants of CSDaV, align internally in the PCR product of CSDaV-RdRp ♦ Iniciadores específicos para las variantes C54 y C1 del CSDaV se alinean internamente en el producto de PCR de CSDaV-RdRp.

[□] EcoRI (GAATTC) and NotI (GCGGCCGC) ♦ EcoRI (GAATTC) y NotI (GCGGCCGC).

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

et al., 2000); C54 and C1 for genomic variants of CSDaV, both kindly provided by T. Nagata (Universidade Católica de Brasília, Brazil).

The reaction mixture consisted of 50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 2.5 mM MgCl₂, 100 μM dNTPs, 100 μM of each primer and 0.6 U Taq pol (Invitrogen). PCR started with a denaturing at 94 °C for 2 min. Followed by 35 amplification cycles of 94 °C for 30 s. (T_m=50 °C for CTV and C54, 55 °C for C1) for 30 s and 72 °C for 30 s, followed by a final extension of 72 °C for 5 min. For reactions, the absolute negative control was sterile water, and as positive control virions purified by density gradients were used from tissue of infected trees symptomatic to CSDaV and CTV.

Detection of genomic strains of CTV and CSDaV acquired by aphids through single-strand conformation polymorphism (SSCP)

The identification of patterns of SSCP was done from the CPK product, as reported by Sambade *et al.* (2002). Strands were separated in a non-denaturing gel of polyacrylamide at 12% in a constant voltage of 200 V for 2.5 h. The gels were visualized using silver nitrate staining (Beidler *et al.*, 1982).

RESULTS AND DISCUSSION

Eight six aphid samples were collected from 16 orchards. The most common citrus colonizing species were *T. citricida* (65%) and *A. spiraecola* (34%). In several orchards insecticides were being used for effective pest control and thus aphids were not found.

Attempts to detect CTV by direct RT-PCR in aphids failed probably due to the low concentration of the viral sequences. The option was to perform nested RT-PCR using CN119 and CN120 as external primers (Cevik *et al.*, 1996b) and CPK as internal primers (Kong *et al.*, 2000). With this adaptation, 55/56 samples of *T. citricida* and 27/30 of *A. spiraecola* were positive for CTV presence independently of virus aggressiveness (Table 3). The use of cross protection and the endemic condition of CTV in the region can explain the high incidence of CTV (Müller *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004).

Detection of CSDaV in plants and aphids has been performed using primers for the genomic region of the viral replicase (Macherroni *et al.*, 2005). In our study, CSDaV was also detected in aphid and plant samples using primers for the genomic region which encodes for the RNA dependent-RNA polymerase (RdRp), which presumably discriminate between C54 and C1 genomic variants (Macherroni *et al.*, 2005).

Strain C54 was found in 23/56 of *T. citricida* samples and in 3/30 of *A. spiraecola* aphid samples from orchards of Minas Gerais (Table 3). This

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se recolectaron 86 muestras de áfidos de 16 huertas. Las especies más comunes que colonizaron los cítricos fueron *T. citricida* (65%) y *A. spiraecola* (34%). En varias huertas se usaron insecticidas para controlar plagas y, por tanto, no se encontraron áfidos.

Los intentos por detectar el CTV por RT-PCR directo en áfidos fracasaron probablemente debido a la baja concentración de las secuencias virales. La opción fue realizar RT-PCR y PCR anidado usando CN119 y CN120 como iniciadores externos (Cevik *et al.*, 1996b) y CPK como iniciadores internos (Kong *et al.*, 2000). Con esta adaptación se encontraron 55/56 muestras de *T. citricida* y 27/30 de *A. spiraecola* positivos para presencia de CTV, independientemente de la severidad del virus (Cuadro 3). El uso de la protección cruzada y la condición endémica del CTV en la zona pueden explicar la alta incidencia de CTV (Müller *et al.*, 1999; Machado *et al.*, 2004).

La detección de CSDaV en plantas y áfidos se ha realizado usando iniciadores para la región genómica de la replicasa viral (Macherroni *et al.*, 2005). En nuestro estudio, el CSDaV también se detectó en muestras de áfidos y plantas usando iniciadores para la región genómica que codifica la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp), los cuales se presume que discriminan entre las variantes genómicas C54 y C1 (Macherroni *et al.*, 2005).

La variedad C54 se encontró en 23/56 de las muestras de *T. citricida* y en 3/30 de las muestras de áfidos *A. spiraecola* provenientes de huertas de Minas Gerais (Cuadro 3). Este producto de amplificación se secuenció y comparó con otras secuencias en el Genbank, las cuales coincidieron con secuencias de CSDaV y la variante CSDaV P15, códigos AY884005.1 y DQ185573.1. Estos resultados confirmaron que la banda que se obtuvo fue la secuencia objetivo. Además, las muestras de huertas libres de MSC localizados en São Paulo fueron negativas.

Discriminación de variantes de CTV presentes en áfidos

La discriminación de variantes de CTV presentes en áfidos se propuso inicialmente con sondas marcadas en el extremo 3' con digoxigenina. Sin embargo, aun cuando se utilizó la sonda 0 que detecta todas las variantes de CTV (Cevik *et al.*, 1996a), se detectó una reacción sólo en muestras experimentales con ARN extraído de plantas. Estos resultados muestran que la sensibilidad de esta técnica es baja y que no puede detectar las bajas concentraciones de secuencias de CTV en áfidos. Por tanto, la variación de haplotipos de

Table 3. Nested RT-PCR detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) and *Citrus sudden disease associated virus* (CSDaV) in samples of *T. citricida* and *A. spiraecola* collected in locations with citrus sudden death (CSD) of Minas Gerais and without CSD of São Paulo (Capela do Alto, Capão Bonito, and Botucatu), Brazil, 2005.

Cuadro 3. Detección por RT-PCR anidado del *Citrus tristeza virus* (CTV) y *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) en muestras de *T. citricida* y *A. spiraecola* recolectados de localidades con muerte súbita de los cítricos (MSC) de Minas Gerais y sin MSC en São Paulo (Capela do Alto, Capão Bonito, y Botucatu), Brasil, 2005.

Location	<i>Toxoptera citricida</i>		<i>Aphis spiraecola</i>	
	CTV	CSDaV [†]	CTV	CSDaV [†]
Minas Gerais [†]	44/44	23/44	23/25	3/25
Capão Bonito, SP	-	-	4/5	0/5
Capela do Alto, SP	5/6	0/6	-	-
Botucatu, SP	6/6	0/6	-	-
Total [§]	55/56	23/56	27/30	3/30
Percentage	98%	42%	90%	10%

[†] Minas Gerais (CSD present) represents data from 12 orchards ✧ Minas Gerais (MSC presente) representa datos de 12 huertas.

[‡] CSDaV C54 strain ✧ Cepa C54 del CSDaV.

[§] X/Y(X=positive samples; Y=number of analyzed samples) ✧ X/Y(X=muestras positivas; Y=número de muestras analizadas).

^p Specie not detected at sampling time ✧ Especie no detectada al momento del muestreo.

amplification product was sequenced and compared with other sequences in the Genbank, which coincided with sequences of CSDaV and CSDaV variant P15, codes AY884005.1 and DQ185573.1. These results confirmed that band obtained was indeed the targeted sequence. Samples from orchards free of CSD located in São Paulo were negatives.

Discrimination of CTV strains present in aphids

Discrimination of CTV strains present in aphids was originally proposed with probes marked in the 3' end with digoxigenine. However, even when using probe 0, which detects all CTV variants (Cevik *et al.*, 1996a), reaction was detected only in test samples with RNA extracted from plants. These results show that sensibility of this technique is low and is not able to detect low CTV sequence concentrations in aphids. Therefore, the variation of haplotypes of CTV present in the collected aphids was analyzed by SSCP; each band was considered to correspond to a strand of the duplex DNA of the gene p25 fragment.

SSCP analysis of sequence variants of CTV in *T. citricida* and *A. spiraecola* did not show a specific profile which would indicate a lower or greater capability of CTV genomic variant acquisition, but seems to place both vector species at the same capability level, at least in the acquisition stage (Table 4 and 5), although there is evidence of the greater efficiency of *T. citricida* as a vector (Huang *et al.*, 2005). However, *T. citricida* had higher capability to acquire CSDaV than *A. spiraecola* when CTV was present. This result may indicate a possible role of CTV as helper virus as reported by Maccherroni *et al.* 2005, but there is not enough data to prove it. If

CTV presentes en los áfidos recolectados se analizó con SSCP; cada banda se consideró que correspondía con una cadena de ADN dúplex del fragmento de gene p25.

El análisis SSCP de variantes de secuencia de CTV en *T. citricida* y *A. spiraecola* no mostraron un patrón específico que indicara una capacidad menor o mayor de adquisición de variantes genómicas de CTV, pero parece colocar ambas especies vectoras en el mismo nivel de capacidad, al menos en la etapa de adquisición (Cuadro 4 y 5), aunque hay evidencia de la mayor eficiencia de *T. citricida* como vector (Huang *et al.*, 2005). No obstante, *T. citricida* tuvo mayor capacidad para adquirir el CSDaV que *A. spiraecola* cuando el CTV estaba presente. Este resultado puede indicar una posible función para el CTV como virus auxiliar según lo sugirieron Maccherroni *et al.* (2005), pero no hay suficientes datos para comprobarlo. Si tal condición auxiliar existe, puede depender también de las especies de áfidos, siendo *T. citricida* más apta que *A. spiraecola*. Aunque otras especies de áfidos, como *A. gossypii*, no pueden descartarse (Maccherroni *et al.*, 2005), la condición de colonización efectiva de cítricos puede ser determinante en una posible interacción CTV-CSDaV-vector.

Las tasas de detección de CSDaV fueron 48% y 88% menos efectivas en *T. citricida* y *A. spiraecola*, que en CTV (Cuadro 3), demostrando que el último virus es más abundante y eficientemente adquirido.

La transmisión de CSDaV por *A. spiraecola* sólo ha sido sugerida por Maccherroni *et al.* (2005); además, la importancia de esta especie de áfidos como vector de CSDaV, si hay tal, podría ser relativamente baja en el campo. Por ende, la atención debiera centrarse en *T. citricida* en relación a su función en la

such helper condition does exist it may also depend on the aphid species, being *T. citricida* more suitable than *A. spiraeicola*. Although other aphid species, such as *A. gossypii*, may not be ruled out (Maccherroni *et*

MSC con la hipótesis del CSDaV. Esta hipótesis es atractiva debido al hecho que el CSDaV estuvo asociado generalmente con áfidos recolectados en huertas con síntomas de MSC, incluso de algunos con

Table 4. Sequence variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) and presence of *Citrus sudden disease associated virus* (CSDaV) in samples of *T. citricida* collected in citrus orchards with citrus sudden death in Minas Gerais, Brazil, 2005.

Cuadro 4. Variantes de secuencia del *Citrus tristeza virus* (CTV) y presencia del *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) en muestras de *T. citricida* recolectadas en huertas de cítricos con muerte súbita de cítricos en Minas Gerais, Brasil, 2005.

Samples	Orchards									
	FR1 [†]		UB1		FR5		FR2		FR4	
	CTV	CSDaV [‡]	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV
1	4	+	2a [§]	-	3	+	2	+	1	+
2	-	-	2	-	2+1 ^p	+	2	+	3	+
3	3	-	2	-	3+1	+				
4	3	+	2a	-						
5	2a	+	2a	-						
6	2a	+	3b	+						
7	2a	-	3b	-						
8	2	+	2	-						
9	2	+	3	-						
10	2a	+	2+1	-						
11	3	-								
12	2a	+								
13	3b	+								
14	2	-								
15	3b	+								

[†] For orchard specific location see Table 1 ❖ Para la localización específica de las huertas, véase el Cuadro 1.

[‡] C54 genomic variant of CSDaV ❖ Cepa C54 del CSDaV.

[§] Similar haplotypes among samples from the same orchard ❖ Haplotipos similares entre muestras de la misma huerta.

^p Presence of two stable conformations for one of the DNA strands ❖ Presencia de dos conformaciones estables para una de las cadenas de ADN.

Table 5. Sequence variants of *Citrus tristeza virus* (CTV) and presence of *Citrus sudden disease associated virus* (CSDaV) in samples of *A. spiraeicola* collected in citrus orchards with citrus sudden death in Minas Gerais, Brazil, 2005.

Cuadro 5. Variantes de secuencia del *Citrus tristeza virus* (CTV) y presencia del *Citrus sudden death-associated virus* (CSDaV) en muestras de *A. spiraeicola* recolectadas en huertas de cítricos con muerte súbita de cítricos en Minas Gerais, Brasil, 2005.

Samples	Orchards							
	PR1 [†]		CG2		FR2		FR3	
	CTV	CSDaV [‡]	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV	CTV	CSDaV
1	3	-	2a [§]	-	3	-	3	-
2	4C	+	-	-	-	+	2+1 ^p	-
3	4C	+	3	-	2+1	+	1	-
4	3+1	-	3	-				
5	2+1	-	3	-				
6	2+1	-	2a	+				
7	3	-						
8	4	-						
9	2+1	-						
10	2	-						
11	2	-						

[†] For orchard specific location see Table 1 ❖ Para la localización específica de las huertas, véase el Cuadro 1.

[‡] C54 genomic variant of CSDaV ❖ Cepa C54 del CSDaV.

[§] Similar haplotypes among samples from the same orchard ❖ Haplotipos similares entre muestras de la misma huerta.

^p Presence of two stable conformations for one of the DNA strands ❖ Presencia de dos conformaciones estables para una de las cadenas de ADN.

al., 2005), the effective citrus colonizing condition may be determinant in a possible CTV-CSDaV-vector interaction.

CSDaV detection rates were 48% and 88% less effective in *T. citricida* and *A. spiraecola*, than that of CTV (Table 3), evidencing that the later virus is more abundant and maybe efficiently acquired.

The transmission of CSDaV by *A. spiraecola* has only been suggested (Macherroni *et al.*, 2005); besides the importance of this aphid species as a vector of CSDaV, if any, could be relatively low at field level. Thus focus should be placed in *T. citricida* regarding its role on CSD under the hypothesis of the CSDaV. This hypothesis was appealing due to the fact that CSDaV was in general associated with aphids collected from orchards with CSD symptoms, even from those sub-grafted with *Citrus reshni* (Hort.) that did not cause symptoms remission as expected (PR1), such as samples 11 and 12 (Figure 1). None aphid sample from São Paulo, free of CSD, showed positive to CSDaV.

Similarly, samples 1, 3, and 4 of *T. citricida* from an orchard with all trees symptomatic to CSD (FR1) were positive for CSDaV. Sample 7 positive for CSDaV and collected from a one year established orchard (CG2), without CSD symptoms but surrounded by plots with CSD symptoms, could provide evidence of the role of CSDaV in the etiology of CSD disease and its transmission to new plantations. In the Uberlândia orchard (UB1) FUNDECITRUS's where

sub-injertos de *Citrus reshni* (Hort.) que no causaron remisión de síntomas como se esperaba (PR1), como las muestras 11 y 12 (Figura 1). Ninguna muestra de áfidos de São Paulo, libre de MSC, fue positiva para CSDaV.

Similarmente, las muestras 1, 3 y 4 de *T. citricida* de una huerta con todos los árboles sintomáticos para MSC (FR1) resultaron positivos para CSDaV. La muestra 7 positiva para CSDaV y recolectada de una huerta establecida durante un año (CG2), sin síntomas de MSC pero rodeado por parcelas con síntomas de MSC, podría proporcionar evidencia de la función del CSDaV en la etiología de la enfermedad MSC y su transmisión a nuevas plantaciones. En la huerta de Uberlândia (UB1), donde los técnicos de FUNDECITRUS clasificaron los árboles en función de la severidad de la MSC, según Román *et al.* (2004), no hubo asociación específica de los patrones de SSCP con la severidad de MSC pero evidenció una mayor complejidad.

Una muestra recolectada de un árbol con un grado de severidad 1 (pérdida de turgencia y brillo de las hojas) tenía dos variantes de secuencia de CTV, mientras que una muestra con mayor severidad (2) tenía tres variantes de secuencia de CTV. Otras muestras con la misma severidad mostraron dos variantes de secuencia y otras dos muestras asintomáticas mostraron una variante de secuencia sencilla.

Un problema en asociar el CSDaV con la MSC fue que no se encontró correlación entre la presencia

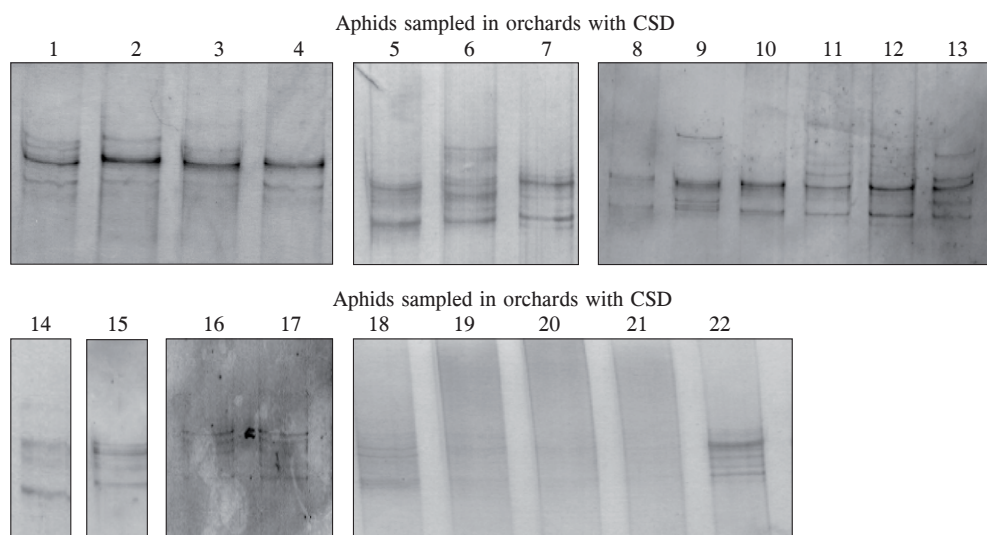


Figure 1. SSCP profiles for a portion of the p25 gene of CTV (CPK) present in aphids. Samples 1 to 7 are *T. citricida*, 8 to 13 are *A. spiraecola* from orchards with CSD. Samples 14 and 15 are *A. spiraecola*, 16 to 22 are *T. citricida* from orchards without CSD.

Figura 1. Perfiles SSCP para una porción del gene p25 del CTV (CPK) presente en áfidos. Las muestras 1 a 7 son *T. citricida*, 8 a 13 son *A. spiraecola* de huertas con MSC. Las muestras 14 y 15 son *A. spiraecola*, 16 a 22 son *T. citricida* de huertas sin MSC.

technicians classified the trees in function of CSD severity according to Román *et al.* (2004), there was no specific association of SSCP profiles with CSD severity other than higher complexity.

A sample collected from a tree rated with severity-1 (loss of swelling and shine in leaves) had two CTV sequence variants, while a sample with greater severity (2) had three CTV sequence variants. Other samples with the same severity showed two sequence variants and another two asymptomatic samples showed a single sequence variant.

A drawback in associating CSDaV with CSD was that no correlation was found among CSDaV presence in all aphid samples collected from symptomatic plants. Yet the presence of this virus in possible vectors provides more elements to understand the behavior of the disease and seem to reduce the feasibility of the hypothesis of a mutant CTV isolate as the cause of CSD. Besides, CSDaV haplotypes homogeneity, even among samples from different orchards, may suggest the recent development or establishment of this virus, since only a small variability was found.

If in fact the putative agent is aphid or winged vector transmitted as the epidemiological data suggest (Bassanezi *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004), then the vector system should be exploited to support the CSD etiology. But in order to confirm the mutant CTV isolate inducing CSD hypothesis, more studies are needed where CTV profiles are analyzed simultaneously in aphids and the shoot where aphids are collected due the uneven distribution of this virus. In our study, only two pairs of primers and seven probes for the p25 genomic region of CTV were used. Probably other genomic regions may provide more insight results and additional studies with molecular and biological approaches should be conducted, since CTV haplotype complexity was lower on the vector than that on the plant (Rivas *et al.*, 2008) confirming our assumption for the study.

CONCLUSIONS

SSCP analysis of *Citrus tristeza virus* sequence variants present in *T. citricida* and *A. spiraeicola*, sampled from citrus sudden death symptomatic or asymptomatic trees but endemic to CTV, did not show a relation between patterns. Therefore a mutant CTV isolate inducing CSD hypothesis was not confirmed.

In contrast, *Citrus sudden death-associated virus* was in general also detected in both aphid species sampled on trees from citrus regions with presence of citrus sudden death. Thus the CSDaV hypothesis could be more feasible. However, detection was 48% (*T. citricida*) and 88% (*A. spiraeicola*) lower than that

de este virus en todas las muestras de áfidos recolectadas de plantas sintomáticas. No obstante, la presencia de este virus en potenciales vectores proporciona más elementos para comprender el comportamiento de la enfermedad y parece reducir la viabilidad de la hipótesis de una variante mutada de CTV como la causa de la MSC. Además, la homogeneidad de haplotipos de CSDaV, aun entre muestras de huertas distintas, sugiere el desarrollo reciente o establecimiento de este virus, dado que sólo se encontró poca variabilidad.

Si el agente putativo es en realidad transmitido por un áfido o vector alado, como sugieren los datos epidemiológicos (Bassanezi *et al.*, 2003; Román *et al.*, 2004), entonces el sistema vector debiera explotarse para apoyar la etiología de la MSC. Para confirmar la hipótesis de la mutación del CTV en la inducción de MSC, se requieren más estudios para analizar patrones de secuencia del CTV simultáneamente en áfidos y en el brote respectivo de recolección debido a la distribución heterogénea del virus. En nuestro estudio, se usaron sólo dos pares de iniciadores y siete sondas para la región genómica p25 del CTV. Probablemente otras regiones genómicas proporcionen resultados complementarios y se requieran estudios adicionales con enfoques molecular y biológico, dado que la complejidad de haplotipos de CTV fue menor en el vector que en la planta (Rivas *et al.*, 2008), conformando lo supuesto en este trabajo.

CONCLUSIONES

El análisis SSCP de las secuencias de las variantes del *Citrus tristeza virus* presentes en *T. citricida* y *A. spiraeicola*, tomadas de muestras de árboles sintomáticos o asintomáticos para la muerte súbita de cítricos pero endémicos al CTV no mostraron una relación entre los patrones. Por tanto, no se confirmó la hipótesis de que una mutante de CTV pueda inducir la MSC.

Por el contrario, el *Citrus sudden death-associated virus* generalmente se detectó en ambas especies de áfidos recolectados de árboles de regiones cítricas con presencia de muerte súbita de los cítricos. Por ende, la hipótesis del CSDaV parece ser más viable. Sin embargo, su detección fue 48% (*T. citricida*) y 88% (*A. spiraeicola*) menor que la de CTV. Por tanto, con escenario del CSDaV, la alta intensidad epidémica de MSC podría explicarse como un sistema de interacción CTV-CSDaV-vector.

—Fin de la versión en Español—



of CTV. Therefore, under the CSDaV scenario, the high CSD epidemic intensity could be explained for a CTV-CSDaV-vector interaction system.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank to CONACYT for financial support, FUNDECITRUS for technical and logistical assistance and to Juliana Freitas-Astúa for the RNA isolation protocol.

LITERATURE CITED

- Ballester-Olmos J. F., J. A. Pina, E. A. Carbonell, P. Moreno, A. Hermoso de Mendoza, M. Cambra, and L. Navarro. 1993. Biological diversity of citrus tristeza virus (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathol.* 42: 219-229.
- Bassanezi R. B., A. Bergamin-Filho, L. Amorim, N. Gimenez-Fernandes, T. R. Gottwald, and J. M. Bove. 2003. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology* 93: 502-512.
- Beidler J. L., P. R. Hilliard, and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acid with silver. *Analytical Biochem.* 126: 374-380.
- Brlansky R. H., V. D. Damsteeggt, D. S. Howd, and A. Roy. 2003. Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Dis.* 87: 397-401.
- Cevik B., S. S. Pappu, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1996a. Detection and differentiation of strains of citrus tristeza closterovirus using point mutation and minor sequence differences in their coat protein genes. *Phytopathology* 86: S101.
- Cevik B., S. S. Pappu, H. R. Pappu, D. Bensch, M. Irely, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1996b. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation. *In: Proceeding of the 13th Conference of IOCV.* Riverside, CA. pp: 17-24.
- Freitas-Astúa J., E. C. Locali, R. Antoniolio, V. Rodrigues, E. W. Kitajima, and M. A. Machado. 2003. Detection of citrus leprosis virus in citrus stems, fruits and the mite vector. *Virus Res.* 8(1): 196.
- Huang Z., P. A. Rundell, X. Guan, and C. A. Powell. 2005. Evaluation of the transmission of different field sources of citrus tristeza virus and the separation of different genotypes by single brown citrus aphids. *Hortscience* 40: 687-690.
- Kong P., L. Rubio, M. Polek, and B. W. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes* 21: 139-145.
- Machado M. A., M. L. P. N. Targón, H. D. Coletta-Filho, e G. W. Müller. 2004. Morte súbita dos citros. *Laranja* 25: 69-79.
- Macherroni W., M. C. Alegria, C. C. Greggio, J. P. Piazza, R. F. Kamla, P. R. A. Zacharias, M. Bar-Joseph, E. W., Kitajima, L. C. Assumpsao, G. Camarote, J. Cardozo, E. C. Casagrande, F. Ferrari, S. F. Franco, P. F. Giacheto, A. Girasol, H. Jr. Jordao, V. H. A. Silva, L. C. A. Souza, C. I. Aguilar-Vildoso, A. S. Zanca, P. Arruda, J. P. Kitajima, F. C. Reinach, J. A. Ferro, and A. C. R. da Silva. 2005. Identification and genomic characterization of a new virus (Tymoviridae Family) associated with citrus sudden death disease. *J. Virol.* 79: 3028-3037.
- Müller G. W., and A. S. Costa. 1977. Tristeza control in Brazil by preimmunization with mild strains. *Proc. Int. Soc. Citriculturist* 3: 868-872.
- Müller G. W., M. L. P. N. Targón, e M. A. Machado. 1999. Trinta anos do uso do clone pré-imunizado 'Pera IAC' na citricultura paulista. *Laranja* 20: 385-398.
- Rivas-Valencia P., E. Loeza-Kuk, G. Mora-Aguilera, D. Ochoa-Martínez, M. A. Gutiérrez-Espinosa, W. C. Jesús J., C. Malvas, y N. A. Wulff. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del Citrus tristeza virus y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil. *Agrociencia* 42: 85-93.
- Román M. P., M. Cambra, J. Juárez, P. Moreno, N. Duran-Vila, F. A. O. Tanaka, E. Alves, E. W. Kitajima, P. T. Yamamoto, R. B. Bassanezi, D. C. Teixeira, W. C. Jesus J., A. J. Ayres, N. Gimenez-Fernandes, F. Rabestein, L. F. Giroto, and J. M. Bove. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88: 453-467.
- Sambade A. L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, J. Guerri, and P. Moreno. 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of citrus tristeza virus: Application to monitoring cross-protection. *Plant Pathol.* 51: 257-263.
- Stoetzel M. B. 1994. Aphids (homoptera:aphididae) of potential importance on citrus in the United States with illustrated keys to species. *Proc. Entomol. Soc. Washington* 96: 74-90.
- Targon M. P. N., G. Astúa-Monge, L. Kishi, J. Freitas-Astúa, A. A. Souza, F. A. Santos, G. W. Muller, e M. A. Machado. 2003. Avaliação de haplotipos do CTV em plantas com sintomas de morte subita dos citros por SSCP e sequenciamento dos genes da p20 e p23. *Summa Phytopatologica* 29: 71-72.