

## ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE AISLAMIENTOS DEL *Citrus tristeza virus* DE YUCATÁN Y TAMAULIPAS\*

### SPATIO-TEMPORAL ANALYSIS OF *Citrus tristeza virus* ISOLATES FROM YUCATÁN AND TAMAULIPAS

Patricia Rivas-Valencia<sup>1§</sup>, Emiliano Loeza-Kuk<sup>2</sup>, Gustavo Mora-Aguilera<sup>3</sup>, Noé Ruiz-García<sup>3</sup>, Daniel Leobardo Ochoa-Martínez<sup>3</sup>, Alejandra Gutiérrez-Espinosa<sup>4</sup> y Vicente Febres<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Valle de México. INIFAP. Carretera Los Reyes-Lechería, km 18.5. Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 595 9212738. Ext. 129. <sup>2</sup>Campo Experimental Mocochoá. INIFAP. Carretera Mérida-Motul, km 25. Mocochoa, Yucatán. C. P. 97457. Tel. 01 991 9162215. (loeza.emiliano@inifap.gob.mx). <sup>3</sup>Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco, km 35.5. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230. Tel. 01 595 9520200. Ext. 1620 y 1629. (morag@colpos.mx), (ldaniel@colpos.mx). <sup>4</sup>Fruticultura. Colegio de Postgraduados. Tel. 01 595 9520200. Ext. 1123. (alexge@colpos.mx). <sup>5</sup>University of Florida. EUA. <sup>§</sup>Autora para correspondencia: rivas.patricia@inifap.gob.mx.

#### RESUMEN

Se estudiaron huertas comerciales de cítricos (*Citrus sinensis* L.), ubicadas en las principales regiones productoras de Yucatán de 2003 a 2006 y en Tamaulipas en 2004. En Yucatán se realizó un estudio espacio-temporal de la dispersión de la tristeza de los cítricos, ocasionada por el *Citrus tristeza virus*, en presencia de *Toxoptera citricida* Kirkaldy. La incidencia inicial ( $X_0$ ) fue de 4.41% y la final ( $X_T$ ) de 39.33%. Los índices de agregación de Morisita y Lloyd dependientes del tamaño óptimo de cuadrante, mostraron un patrón agregado con valores entre 1.41 y 2.39. Además, se caracterizaron molecularmente aislamientos del *Citrus tristeza virus*, para examinar la diversidad del virus presente. Se analizaron aislamientos del virus con single-strand conformation polymorphism, observándose hasta dos haplotipos por aislamiento y tres tipos de patrones en Yucatán. En Tamaulipas, con la caracterización molecular, se identificaron tres haplotipos por aislamiento y siete patrones. El coeficiente de similitud calculado para estas dos poblaciones de aislamientos fue de 0.7, asumiéndose un origen común de ambas poblaciones. El análisis de varianza molecular, indicó mayor variabilidad dentro de las poblaciones (69%) y entre ellas (31%),

#### ABSTRACT

Citric (*Citrus sinensis* L.) commercial vegetable gardens were studied, located in the main producing regions of Yucatán from 2003 to 2006 and in Tamaulipas in 2004. In Yucatán it was carried out a space-time study of dispersion of citric tristeza, caused by *Citrus tristeza virus*, in presence of *Toxoptera citricida* Kirkaldy. The initial incidence ( $X_0$ ) was of 4.41% and the final ( $X_T$ ) was of 39.33%. The aggregation indexes of Morisita and Lloyd dependent of the optimum size of quadrant showed an added pattern with values between 1.41 and 2.39. Also, isolations of *Citrus tristeza virus* were molecularly characterized to examine the diversity of current virus. Virus isolations were analyzed with single-strand conformation polymorphism, being observed up to two haplotypes by isolation and three types of patterns in Yucatán. In Tamaulipas, with the molecular characterization, three haplotypes were identified by isolation and seven patterns. The similarity coefficient calculated for these two populations of isolations was of 0.7, being assumed a common origin for both populations. The analysis of molecular variance indicated bigger variability inside the populations (69%) and between them (31%), proving that both citric regions share variants characterized as of

\* Recibido: mayo de 2010  
Aceptado: diciembre de 2010

comprobando que ambas regiones cítricas, comparten variantes caracterizadas como de tipo moderado, mismo que puede justificar la ausencia de sintomatología atribuible a tristeza. Los análisis realizados para identificar el patrón de dispersión de los aislamientos en campo no evidenciaron la dispersión entre árboles e hileras.

**Palabras clave:** autocorrelación, coeficiente de similitud, estructura poblacional, haplotipo.

## INTRODUCCIÓN

En el cultivo de cítricos en México, el portainjerto predominante es el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), susceptible al *Citrus tristeza virus* (CTV); patógeno responsable de epidemias de la tristeza de los cítricos; sin embargo, a diferencia de otros países, no se han presentado los síntomas típicos de tristeza como decaimiento rápido de los árboles y disminución importante de la producción (Garnsey *et al.*, 1987). En México desde 2003, se estudian aspectos poblacionales del CTV, el cual está presente en casi todas las regiones cítricas excepto en los estados de Sinaloa, Querétaro y Chiapas (SENASICA, 2010).

Este virus se transmite de forma natural por diversas especies de áfidos, entre las que sobresalen por su aparente eficiencia de selección y transmisión de aislamientos, en orden de importancia y presencia en México: *Toxoptera citricida* Kirkaldy, *Aphis gossypii* Glover, *A. spiraecola* Patch, *A. fabae* Scopoli y *T. auranti* Boyer de Fonscolombe (Gaona *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001). *T. citricida* ingresó el año 2000, a través de la península de Yucatán (Michaud y Álvarez, 2000) y actualmente se encuentra en Tabasco, Chiapas, Veracruz, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Oaxaca y Guerrero (SENASICA, 2010), representa un factor de riesgo importante para la citricultura nacional, debido a su aparente eficiencia de transmisión de aislamientos que causan sintomatología de tipo severo (d'Urso *et al.*, 2000; Powell y Lin, 2005).

En los estados de Nuevo León, Colima, Baja California, Veracruz (Silva *et al.*, 2001; Mendoza *et al.*, 2003; Herrera, 2004) y Tamaulipas (Loeza *et al.*, 2005), se han detectado y caracterizado molecularmente aislamientos de CTV, que inducen síntomas con alto grado de severidad. Poco se conoce sobre la estructura poblacional del CTV (composición y frecuencia de aislamientos) existente en un

moderate type, which can justify the absence of symptoms attributable to tristeza. The analyses carried out to identify dispersion pattern of the isolations in field didn't evidence the dispersion between trees and rows.

**Key words:** autocorrelation, coefficient of similarity, populational structure, haplotype.

## INTRODUCTION

In citric cultivation in Mexico, sour orange (*Citrus aurantium* L.) is the predominant rootstock, susceptible to *Citrus tristeza virus* (CTV); pathogen responsible for epidemics of citric fruits tristeza; however, contrary to other countries, the typical symptoms of tristeza as fast decline of trees and important production decrease have not been presented (Garnsey *et al.*, 1987). In Mexico from 2003, populational aspects of CTV are studied, which is present in almost all citric regions except in States of Sinaloa, Querétaro and Chiapas (SENASICA, 2010).

This virus is transmitted in a natural way by several species of aphids, among those that stand out for its apparent efficiency selection and transmission of isolations, in order of importance and presence in Mexico are: *Toxoptera citricida* Kirkaldy, *Aphis gossypii* Glover, *A. spiraecola* Patch, *A. fabae* Scopoli and *T. auranti* Boyer de Fonscolombe (Gaona *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001). *T. citricida* entered the year 2000, through the peninsula of Yucatán (Michaud and Álvarez, 2000) and at the moment it is in Tabasco, Chiapas, Veracruz, Puebla, Hidalgo, San Luis Potosí, Oaxaca and Guerrero (SENASICA, 2010), it represents an important risk factor for national citriculture, due to its apparent efficiency of transmission of isolations that cause severe type symptoms (d'Urso *et al.*, 2000; Powell and Lin, 2005).

In States of Nuevo León, Colima, Baja California, Veracruz (Silva *et al.*, 2001; Mendoza *et al.*, 2003; Herrera, 2004) and Tamaulipas (Loeza *et al.*, 2005) have been detected and molecularly characterized isolations of CTV that induce symptoms with high grade of severity. Little it is known on the populational structure of CTV (composition and frequency of isolations) existent in a space and time context in Mexico; therefore it is indispensable their study for the design of epidemics control strategies that allow to determine the risk of changes in their intensity for the increment in frequency of isolates of severe type.

contexto espacial y temporal en México, por tanto resulta indispensable su estudio para el diseño de estrategias de control de epidemias, que permitan determinar el riesgo de cambios en su intensidad por el incremento en la frecuencia de aislados de tipo severo.

Este estudio planteó la hipótesis que la presencia de *T. citricida* en Yucatán determinaría una estructura poblacional compleja, heterogénea y dinámica de aislamientos de CTV, con prevalencia a aislamientos de tipo severo, caracterizados molecularmente y dispuestos espacialmente en agregados, que provocarían epidemias intensas. En el caso de Tamaulipas ante la ausencia de *T. citricida* y la presencia de otras especies de áfidos vectores como *A. gossypii*, la estructura poblacional del CTV, estaría compuesta predominantemente por aislamientos de tipo moderado, caracterizados molecularmente y menor complejidad, distribuidos espacialmente en agregados de menor intensidad.

El objetivo de esta investigación fue realizar un estudio poblacional y epidemiológico de aislamientos de CTV con técnicas clásicas y moleculares, para identificar la prevalencia diferencial de los aislamientos y detectar temporalmente cambios en la estructura poblacional y el comportamiento espacial del CTV, derivado de la presencia de *T. citricida*, que sustente la implementación de acciones de predicción, prevención y control de la enfermedad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Ubicación del área de estudio.** En 2003 y 2004, se realizaron muestreos y colectas de material propagativo de árboles positivos a CTV, en huertas comerciales ubicadas en el municipio de Ticul en el estado de Yucatán y en el estado de Tamaulipas en los municipios de Mante, Padilla, Güemez y Llera (Cuadro 1). Para realizar los análisis espaciales y temporales, se seleccionaron las huertas con mayor incidencia histórica de árboles infectados por CTV, aún y cuando éstos fueron erradicados (NOM-031-FITO 2001), como ocurrió en el caso de Yucatán, en el cual el estudio se continuó en 2004 y 2006 (Cuadro 1). En Tamaulipas, la huerta contaba con los árboles positivos a CTV en pie.

**Diagnóstico.** Para la detección de árboles positivos a CTV se realizó con DAS-ELISA, utilizando los reactivos y protocolo de Agdia Inc. y con el kit de inmunopresión ELISA-directo

This study outlined the hypothesis that presence of *T. citricida* in Yucatán would determine a complex, heterogeneous population structure and dynamics of isolations of CTV, with prevalence to isolations of severe type, molecularly characterized and spacially prepared in aggregates that would cause intense epidemics. In the case of Tamaulipas with the absence of *T. citricida* and the presence of other species of vectorial aphids as *A. gossypii*, the population structure of the CTV, would be compound predominantly for isolations of moderate type, molecularly characterized and smaller complexity, distributed spacially in aggregates of smaller intensity.

The objective of this investigation was to carry out a population and epidemic study of isolations of CTV with classic and molecular techniques, to identify the differential prevalence of the isolations and to detect temporarily changes in the populational structure and the space behavior of the CTV, derived of the presence of *T. citricida* that sustains the implementation of disease prediction prevention and control actions.

## MATERIALS AND METHODS

**Location of study area.** In 2003 and 2004, there were carried out sampling and collections of propagative material of trees positive to CTV, in commercial vegetable gardens located in the municipality of Ticul in State of Yucatán and in State of Tamaulipas in the municipalities of Mante, Padilla, Güemez and Llera (Table 1). To carry out the space and temporary analyses, the vegetable gardens were selected with bigger historical incidence of trees infected by CTV, even when these were eradicated (NOM-031-FITO 2001), as it happened in case of Yucatán, in which the study continued in 2004 and 2006 (Table 1). In Tamaulipas, the vegetable garden had ongoing trees positive to CTV.

**Diagnostic.** For detection of trees positive to CTV was carried out with DAS-ELISA, using the reagents and protocol of Agdia Inc. and with the kit of Elisa-direct immunoprint (Plant Print Diagnostics SL.), which use antibodies 3DF1 and 3CA5, according to procedure of Ruiz *et al.* (2009) and considering sensibility of each one of the techniques.

**Sampling of vegetable material.** The vegetable material that was collected consisted of sticks, sprouts and young leaves taken of four cardinal points of tree canopy, at an average height of 1.5 m.

**Cuadro 1. Número de árboles de naranjo (*Citrus sinensis*) positivos a CTV en huertas comerciales de Yucatán y Tamaulipas, México.**

**Table 1. Number of orange trees (*Citrus sinensis*) positive to CTV in commercial vegetable gardens of Yucatán and Tamaulipas, Mexico.**

Nombre de la huerta	Municipio	Árboles + CTV			
		2003	2004	2006	2003-2006
Yucatán*					
Presencia de <i>Toxoptera citricida</i>					
C2	Ticul	11	46	49	106
C3 <sup>‡</sup>		5	-	-	5
U2 <sup>‡</sup>		1	-	-	1
Total					112
Tamaulipas					
Ausencia de <i>Toxoptera citricida</i>					
E1	Mante	-	95 <sup>‡</sup>	-	-
L2 <sup>‡</sup>	Padilla	-	2 <sup>‡</sup>	-	-
L3 <sup>‡</sup>	Güemez	-	2 <sup>‡</sup>	-	-
L4 <sup>‡</sup>	Güemez	-	6 <sup>‡</sup>	-	-
F5 <sup>‡</sup>	Llera	-	9 <sup>‡</sup>	-	-
Total			114		

\*=huertas mixtas (chicozapote (*Manilkara zapota*), mamey (*Pouteria sapota*), aguacate (*Persea americana*), papayo (*Carica papaya*), plátano (*Musa sp.*) y coco (*Cocos nucifera*), con arreglo topológico irregular; <sup>‡</sup>= árboles erradicados en 2004 y 2005; <sup>‡</sup>= huerta sin seguimiento temporal de la enfermedad.

(Plant Print Diagnostics SL.), que utilizan los anticuerpos 3DF1 y 3CA5, de acuerdo al procedimiento de Ruiz *et al.* (2009) y considerando la sensibilidad de cada una de las técnicas.

**Muestreo de material vegetal.** El material vegetal que se colectó consistió de varetas, brotes y hojas jóvenes tomados de los cuatro puntos cardinales del dosel del árbol, a una altura promedio de 1.5 m.

**Conservación de material propagativo.** Las varetas colectadas de los árboles positivos a CTV, se sumergieron en oxiclورو de cobre al 2.5% para desinfección y se envolvieron en papel dentro de bolsas de plástico, almacenándose en refrigeración a 4 °C.

**Análisis espacio-temporal.** En Yucatán los datos de incidencia de árboles positivos a CTV, se seleccionó la huerta identificada como C2, se construyó un mapa de dispersión de la tristeza de los cítricos con el programa Surfer<sup>®</sup> 6.04. Se calcularon, para cada fecha de muestreo, los índices de agregación de Morisita (Morisita, 1959) y Lloyd (Lloyd, 1967) dependientes del tamaño óptimo de cuadrante (TOC) propuesto por Greig (1952) y se llevó a cabo un análisis de autocorrelación espacial para determinar la intensidad y orientación de agregación usando el programa LCOR<sup>®</sup> (Gottwald *et al.*, 1992).

**Propagative material conservation.** The collected sticks of trees positive to CTV, were sunk in copper oxychloride at 2.5% for disinfection and were wrapped in paper inside plastic bags, stored in refrigeration at 4 °C.

**Space-time analysis.** In Yucatán the incidence data of trees positive to CTV, was selected vegetable garden identified as C2, a dispersion map of citric fruit tristeza was built with Surfer<sup>®</sup> 6.04 software. For each sampling date were calculated the indexes of aggregation of Morisita (Morisita, 1959) and Lloyd (Lloyd, 1967) depending on the optimum quadrant size (TOC) proposed by Greig (1952) and it was carried out an analysis of space autocorrelation to determine the intensity and aggregation orientation using the software LCOR<sup>®</sup> (Gottwald *et al.*, 1992).

**Characterization of populational structure of CTV.** It was carried out RNA extraction and RT-PCR for the partial amplification of the gene that codes proteina layer (CP) of CTV. Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>) was used, for the extraction of total RNA of each sample (100 mg of fresh leaf), according to maker's protocol (Num. Cat. 15596-018) RT-PCR. A portion of the gene p25 was amplified that codes to CP in the end 3' (273 pb) for RT-PCR of one step, using 5 µL of total RNA preheated during 5 min at 65 °C, mixed in a final volume of 5 µL using

**Caracterización de la estructura poblacional de CTV.** Se realizó la extracción de RNA y RT-PCR para la amplificación parcial del gen que codifica la capa proteica (CP) del CTV. Se usó Trizol<sup>®</sup> Reagent (Invitrogen<sup>™</sup>), para la extracción de RNA total de cada muestra (100 mg de hoja fresca), según protocolo del fabricante (Cat. Núm. 15596-018) RT-PCR. Se amplificó una parte del gen p25 que codifica a la CP en el extremo 3' (273 pb) por RT-PCR de un paso, utilizando 5 µL de RNA total precalentado por 5 min a 65 °C, mezclado en un volumen final de 50 µL usando 10x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de DDT, 200 Mm de DNTP's, 0.5 µL (100 ng µL<sup>-1</sup>) de los iniciadores específicos CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA3' y CPKR 5'TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000), 20 unidades de RNaseout (Invitrogen<sup>™</sup>), 50 unidades de M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen<sup>™</sup>) y 1.25 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega<sup>™</sup>).

El programa de amplificación constó de 35 ciclos de 2 min a 94 °C, 2 min a 55 °C y 2 min a 72 °C seguido de un periodo de extensión de final de 10 min a 72 °C. El producto de la amplificación se analizó en gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio. Se utilizó single-strand conformation polymorphism (SSCP), para detectar mutaciones y cambios puntuales de bases en fragmentos de ADN del mismo tamaño (polimorfismo), que permita la identificación de patrones (Kong *et al.*, 2000), se realizó según metodología descrita en Rivas *et al.* (2008).

**PCR selectiva.** Adicionalmente, las muestras se sometieron a RT-PCR de dos pasos (síntesis de cADN y PCR) con los iniciadores RF 137 5' CCG TAR AGG GAC KAT CGG C 3'/PM 34 5'TGG TGT AAA TCC CAA CCA GAC GGT TG 3' y RF 137/PM 35 5'ATC GCG CAT CTG GCG CAA AC 3', que amplifican un segmento de 229 y 115 pb de la región terminal 5' no traducida (UTR); que diferencian aislamientos de tipo T-385 (moderado) y T-36 (severo), respectivamente (Ayllón *et al.*, 2001).

**Epidemiología molecular.** En Yucatán y Tamaulipas, se construyeron mapas de dispersión de los patrones electroforéticos con el programa Surfer 6.04<sup>®</sup> y se realizó el análisis de la distancia al árbol positivo más cercano (Ruiz, 2008) y dinámica de dispersión de focos (Jesus y Bazanessi, 2004), para examinar y establecer el comportamiento espacial de éstos con y sin presencia de *T. citricida*. Se determinó la frecuencia de los patrones electroforéticos caracterizados en el tiempo y se construyeron gráficas de frecuencias.

10x PCR buffer, 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de DDT, 200 Mm de DNTP's, 0.5 µL (100 ng µL<sup>-1</sup>) of the specific initiators CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA3' y CPKR 5'TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC3' (Kong *et al.*, 2000), 20 units of RNaseout (Invitrogen<sup>™</sup>), 50 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen<sup>™</sup>) and 1.25 units of Taq DNA Polymerase (Promega<sup>™</sup>).

The amplification program consisted from 35 cycles of 2 min at 94 °C, 2 min at 55 °C and 2 min at 72 °C followed by a period of final extension of 10 min at 72 °C. The product of amplification was analyzed in agarose gel at 1% colored with ethidium bromide. It was used single-strand conformation polymorphism (SSCP), to detect mutations and punctual changes of bases in fragments of DNA of the same size (polymorphism) that allows identification of patterns (Kong *et al.*, 2000), was carried out according to methodology described in Rivas *et al.* (2008).

**Selective PCR.** Additionally, the samples underwent RT-PCR of two steps (ADN synthesis and PCR) with the initiators RF 137 5' CCG TAR AGG GAC KAT CGG C 3'/PM 34 5'TGG TGT AAA TCC CAA CCA GAC GGT TG 3' and RF 137/PM 35 5'ATC GCG CAT CTG GCG CAA AC 3' that amplify a segment of 229 and 115 pb of the terminal region 5' not translated (UTR); that differentiate type isolations type T-385 (moderate) and T-36 (severe), respectively (Ayllón *et al.*, 2001).

**Molecular epidemiology.** In Yucatán and Tamaulipas, dispersion maps of electrophoresic pattern were built with Surfer 6.04<sup>®</sup> software and was carried out the analysis from distance to nearest positive tree (Ruiz, 2008) and dynamics of dispersion of focuses (Jesus and Bazanessi, 2004), to examine and to establish space behavior of these with and without presence of *T. citricida*. The frequency of the electrophoresic pattern was determined characterized in the time and frequencies graphs were built.

**Populations analysis.** Vectors of presence (1) and absence (0) of SSCP bands were used, to build matrixes of square of Euclidian distance defined as  $E = \xi_{xy}^2 = n[(1-2n_{xy})/2n]$ ; where,  $2n_{xy}$  = number of markers shared by two individuals;  $n$  = total number of polymorphic bands. With each one of the matrixes dendrograms were generated by method of unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) with the NTSYSpc ver. 2.10L software. This way, the analysis of the variations of the profile of SSCP of gene p25 of the obtained proteic layer of asymptomatic plants of the two studied

**Análisis de poblaciones.** Fueron utilizadas vectores de presencia (1) y ausencia (0) de bandas SSCP, para construir matrices del cuadrado de la distancia Euclidiana definida como  $E = \xi_{xy}^2 = n[(1-2n_{xy})/2n]$ ; donde,  $2n_{xy}$  = número de marcadores compartidos por dos individuos;  $n$  = número total de bandas polimórficas. Con cada una de las matrices se generaron dendrogramas por el método de promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA) con el programa NTSYSpc ver. 2.10L. Así, el análisis de las variaciones del perfil de SSCP del gen p25 de la capa proteica obtenidas de plantas asintomáticas de las dos regiones geográficas estudiadas, fueron sometidas a un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

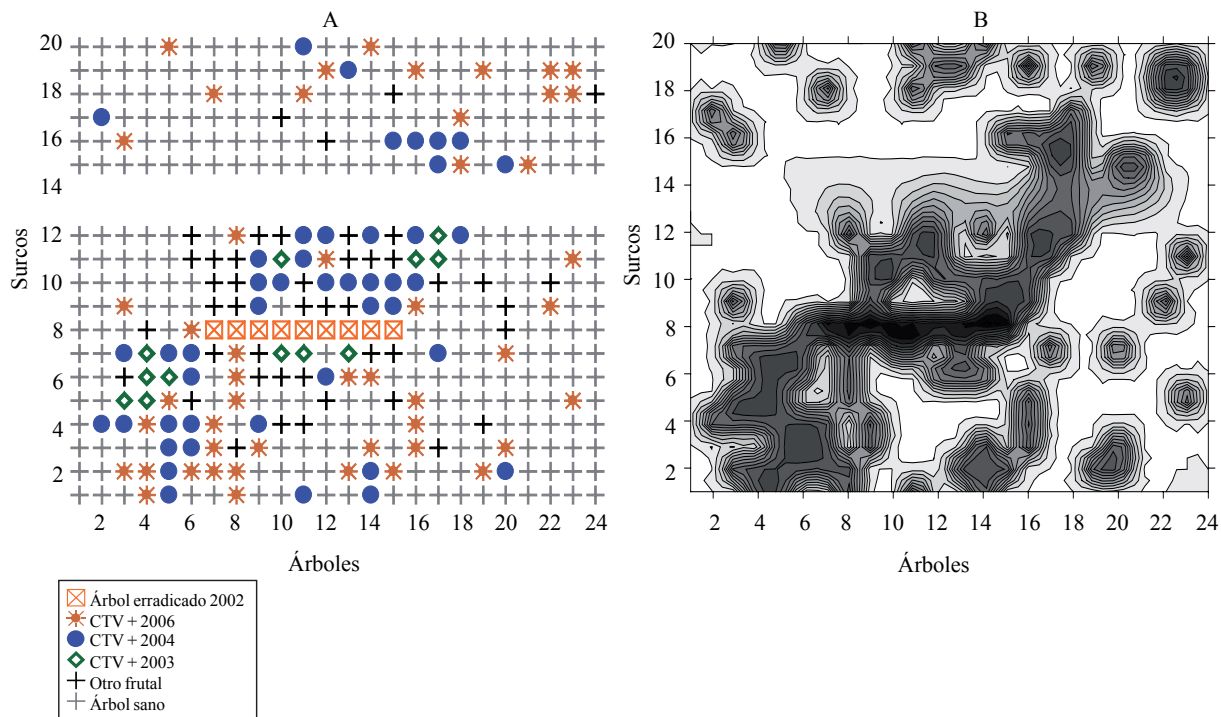
En Yucatán, la incidencia inicial de tristeza fue 4.41% y se incrementó hasta 39.33%. La exploración del mapa de dispersión de la tristeza de los cítricos de 2003 a 2006 (Figura 1), mostró una agregación intensa, lo cual

geographical regions, they were subjected to an analysis of molecular variance (AMOVA) with the GenAlEx6 software (Peakall and Smouse, 2006).

## RESULTS AND DISCUSSION

In Yucatán, the initial incidence of tristeza was 4.41% and it was increased up to 39.33%. The exploration of citric tristeza dispersion map from 2003 to 2006 (Figure 1) showed an intense aggregation, which can be associated to the settler habit of *T. citricida* on one hand and for another to the composition of the vegetable garden of mixed nature (presence of other fruit trees) that, in general, could cause a confinement effect of the present aphids, that under monoculture conditions, don't have the habit of remaining in the citric trees (*Aphis gossypii*).

The host diversity affects the incidence of disease in two forms: 1) changes in population of the vectorial insects, affecting colonization, migration, reproduction or mortality; and 2) the rate of transmission of the pathogen can change as



**Figura 1. A) mapa de dispersión espacio-temporal de árboles positivos a CTV; B) mapa de isolíneas con orientación y tamaño de árboles positivos a CTV en Yucatán, México (2003-2006).**

**Figure 1. A) dispersion map of time-space of trees positive to CTV; B) contour map with orientation and size of trees positive to CTV in Yucatán, Mexico (2003-2006).**

puede estar asociado al hábito colonizador de *T. citricida* por un lado y por otro a la composición de la huerta de naturaleza mixta (presencia de otros árboles frutales) que en general, podría causar un efecto confinamiento de los áfidos presentes, que en condiciones de monocultivo, no tienen el hábito de permanecer en los árboles de cítricos (*Aphis gossypii*).

La diversidad de hospedantes afecta la incidencia de la enfermedad en dos formas: 1) cambios en la población de los insectos vectores, afectando la colonización, migración, reproducción o mortalidad; y 2) la tasa de transmisión del patógeno puede cambiar como efecto del comportamiento o hábito alimenticio del vector (Powell, 1991).

Los índices de Morisita y Lloyd dependientes del tamaño óptimo de cuadrante mostraron para el 2003, 2004 y 2003-2006 un comportamiento de tipo agregado con valores entre 1.41-2.03 y 1.54-2.39, respectivamente (Cuadro 2). Lo anterior confirmó de manera cuantitativa, la disposición espacial en agregados de árboles con CTV en presencia de *T. citricida*, identificada también en el mapa de dispersión para la huerta C2 (Figura 1). Este comportamiento fue identificado en Costa Rica y República Dominicana por Gottwald *et al.* (1998).

effect of vector food behavior or habit (Powell, 1991). The indexes of Morisita and Lloyd dependent of the optimum size of quadrant showed for 2003, 2004 and 2003-2006 an aggregated behavior type with values between 1.41-2.03 and 1.54-2.39, respectively (Table 2). This confirmed in a quantitative way, the space disposition in aggregates of trees with CTV in presence of *T. citricida*, also identified in the dispersion map for the vegetable garden C2 (Figure 1). This behavior was identified in Costa Rica and Dominican Republic by Gottwald *et al.* (1998).

The uniform pattern that was showed in 2006, with values of 0.93 and 0.91 for Morisita and Lloyd, respectively (Table 2), it could be consequence of limited availability of healthy citric trees, as well as the presence of other vectorial aphids as *Aphis gossypii*, second vector with more importance (Yokomi *et al.*, 1994).

The autocorrelation analyses for this same vegetable garden, showed continuous space dependence (aggregation) of up to 21 trees (west-east direction) and a discontinuous dependence of order five, six and 12 (north-south direction), during three evaluations (Table 2). However, considering the mixed nature of the vegetable garden, these analyses cannot be conclusive.

**Cuadro 2. Incidencia, índices de Morisita y Lloyd, tipo de patrón y dependencia espacial de árboles positivos a CTV, en una huerta citrícola de Yucatán, México (2003-2006).**

**Table 2. Incidence, indexes of Morisita and Lloyd, pattern type and space dependence of trees positive to CTV, in a citric vegetable garden of Yucatán, Mexico (2003-2006).**

Árboles + CTV	Incidencia <sup>z</sup> (%)	Índices		Tipo de patrón <sup>x</sup>	Análisis de autocorrelación espacial <sup>w</sup>		
		Morisita	Lloyd		Oeste-Este	Norte-Sur	N-E/S-O <sup>v</sup>
Tamaño óptimo de cuadrante: 32							
2003							
12	4.41	1.77	1.92	Agregado	C21**	C1** D5 y 6*	C1** D6**
2004							
46	16.91	2.03	2.39	Agregado	C21**	C1** D5 y 6*	C1** D5* y 6**
2005							
49	18.01	0.93	0.91	Uniforme	C21**	C1** D6 y 12	C1** D6**
2003-2006							
106	39.33	1.41	1.54	Agregado	C21**	C1** D5 y 6* D12**	C1** D5* D6**

<sup>z</sup>= incidencia absoluta restrictiva (18 hileras\*24 árboles) con un total de 272 árboles de cítricos; <sup>w</sup>= Valores mayores a 1= agregado, iguales a 1= aleatorio y menores a 1= uniforme; <sup>x</sup>= C y D, representan una dependencia espacial continua y discontinua, respectivamente; los números indican el grado u orden de dependencia; <sup>v</sup>= nivel de significancia 0.05; \* = nivel de significancia 0.01; <sup>v</sup>= direccionalidad en diagonal.

El patrón uniforme que se presentó en 2006, con valores de 0.93 y 0.91 para Morisita y Lloyd, respectivamente (Cuadro 2), pudo ser consecuencia de la disponibilidad limitada de árboles de cítricos sanos, así como la presencia de otros áfidos vectores como *Aphis gossypii*, segundo vector con mayor importancia (Yokomi *et al.*, 1994).

Los análisis de autocorrelación para esta misma huerta, mostraron dependencia espacial continua (agregación) de hasta 21 árboles (dirección oeste-este) y una dependencia discontinua de orden cinco, seis y 12 (dirección norte-sur), durante las tres evaluaciones (Cuadro 2). Sin embargo, considerando la naturaleza mixta de la huerta, estos análisis pueden no ser concluyentes.

### Caracterización molecular y epidemiología

En las tres huertas de Yucatán estudiadas en 2003, se caracterizaron tres patrones electroforéticos por SSCP; donde, I= tres bandas; II= dos bandas; III= tres bandas con diferente migración al patrón I; Mm= marcador molecular, utilizado sólo como referencia de distancia de migración (Figura 2).

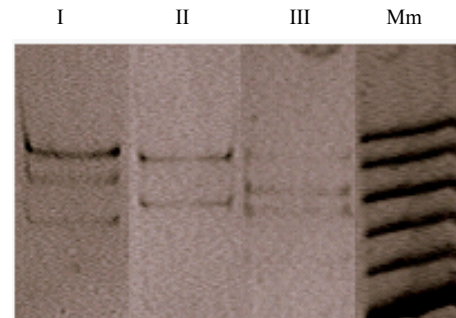
En la huerta C2 se identificaron dos patrones electroforéticos de dos y tres bandas, si consideramos que una banda corresponde a una cadena de ADN dúplex, existe entonces una combinación de hasta dos haplotipos en cada aislamiento. Una estructura poblacional simple comparada con la encontrada en aislamientos de CTV en otros países; por ejemplo, en Brasil se encontraron hasta siete haplotipos interactuando en un aislamiento (Rivas *et al.*, 2008). La PCR selectiva amplificó únicamente un segmento de 229 pb, que caracteriza a aislamientos con una severidad moderada tipo T-385.

El comportamiento temporal de los patrones identificados en la huerta C2 (patrones I y II), determinado por su frecuencia en campo (Figura 3), indica los siguientes eventos: 1) presencia de dos patrones electroforéticos, I= patrón con tres bandas y II= patrón con dos bandas; 2) la prevalencia del patrón I se presentó en 2003 y 2006; y 3) el patrón II prevaleció en el 2004 y se mantuvo en 2006; esto es una evidencia de cambios en la estructura poblacional, ligados a procesos de aloinfección; es decir, de infecciones provenientes de otros árboles.

Los eventos antes descritos, muestran un comportamiento dinámico de la población de los aislamientos de CTV, determinados por la relación entre la planta y el vector

### Molecular characterization and epidemiology

In the three vegetable gardens of Yucatán studied in 2003, three electrophoresic patterns were characterized by SSCP; where, I= three bands; II= two bands; III= three bands with different migration to pattern I; Mm= molecular marker, only used as reference of migration distance (Figure 2).



**Figura 2. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV en Yucatán, México.**

**Figure 2. Electrophoresic patterns obtained by SSCP of a portion of proteic layer (p25) from isolations of CTV in Yucatán, Mexico.**

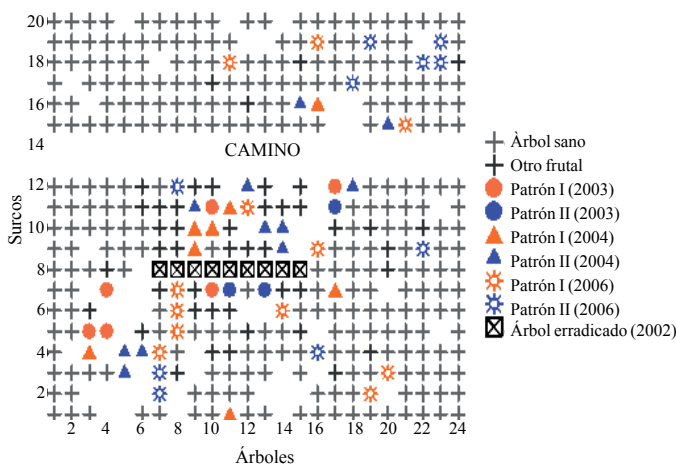
In the vegetable garden C2 two electrophoresic patterns of two and three bands were identified, if we consider that a band corresponds to a chain of the duplex DNA, it exists a combination then of up to two haplotypes in each isolation. A simple populational structure compared with the opposing one in isolations of CTV in other countries; for example, in Brazil were up to seven haplotypes interacting in an isolation (Rivas *et al.*, 2008). The selective PCR only amplified a segment of 229 pb that characterizes to isolations with a severity moderate type T-385.

The temporary behavior of patterns identified in the vegetable garden C2 (pattern I and II), determined by their frequency in field (Figure 3), it indicates the following events: 1) presence of two electrophoresic patterns, I= pattern with three bands and II= pattern with two bands; 2) the prevalence of pattern I was showed in 2003 and 2006; and 3) the pattern II prevailed in the 2004 and it stayed in 2006; this is an evidence of changes in the populational structure, linked to aloinfection processes; that is to say, of infections coming from other trees.

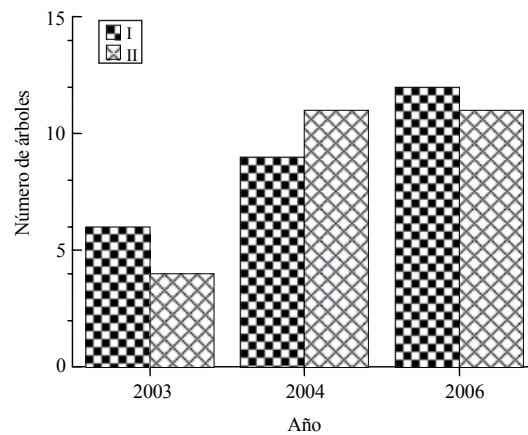


(Sentandreu *et al.*, 2006; Nolasco *et al.*, 2007), las propiedades biológicas y poblacionales del virus (Moya *et al.*, 1999), además de otros factores del entorno, como son la áfido-fauna presente, en especial *T. citricida* (Gaona *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001), el clima, manejo, entre otros. La ausencia del patrón III en esta huerta pero identificado en la región puede deberse a diversos factores como son: el periodo del estudio, el origen del material vegetal propagativo e inóculo inicial asociado a éste; eventos de segregación, recombinación o cuellos de botella poblacional de los haplotipos presentes en la planta (Rubio *et al.*, 2001; Nolasco *et al.*, 2007) o procesos de autoinfección (múltiples infecciones en un mismo árbol). La menor frecuencia del patrón II, puede ser consecuencia de la capacidad limitada para permanecer o mantenerse en la naturaleza.

El mapa de dispersión de los aislamientos de CTV en la huerta C2 de la Figura 4, los espacios en blanco, son árboles positivos a CTV cuyo aislamiento no fue caracterizado molecularmente; en la cual se muestra que la disposición espacial del patrón electroforético I (circulo claro) está mayormente distribuido; sin embargo, no es evidente si la dispersión de este patrón se lleva a cabo entre árboles o entre hileras. Otra situación relevante es que en torno a los árboles erradicados en 2002 (Figura 4, cuadro con cruz interna), sólo están presentes los patrones electroforéticos I y II, el patrón electroforético III observado en otra huerta, parece no estar relacionado con los anteriores, por lo que es muy posible que pueda provenir de una fuente diferente.



**Figura 4. Mapa de dispersión de aislamientos de CTV en Yucatán, México (2003-2006).**  
**Figure 4. Dispersion map of CTV isolations in Yucatán, Mexico (2003-2006).**



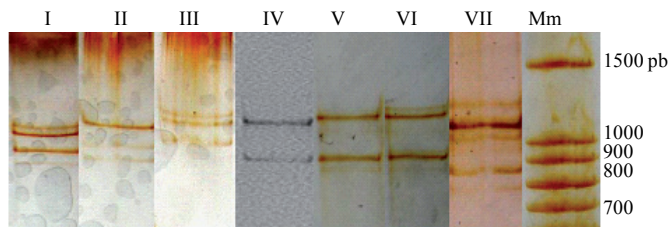
**Figura 3. Distribución de frecuencias de patrones electroforéticos presentes en los árboles durante tres años en Yucatán, México.**  
**Figure 3. Frequencies distribution of electrophoresic patterns present in the trees during three years in Yucatán, Mexico.**

The events above described show a dynamic behavior of the population of the isolations of CTV, determined by the relationship between the plant and the vector (Sentandreu *et al.*, 2006; Nolasco *et al.*, 2007), the biological and populational properties of the virus (Moya *et al.*, 1999), besides other factors of the environment, as the present aphids, especially *T. citricida* (Gaona *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2001), the climate, handling, among others. The pattern's absence III in this vegetable garden but identified in the region it can be due to diverse factors as: the period of the study, the origin of the propagative vegetable material and initial inoculum associated to this; segregation events, recombination or populational bottle necks of the present haplotypes in the plant (Rubio *et al.*, 2001; Nolasco *et al.*, 2007) or self-infection processes (multiple infections in one same tree). The smaller frequency of pattern II can be consequence of the limited capacity to remain or to stay in the nature.

The dispersion map of the isolations of CTV in the vegetable garden C2 of the Figure 4, clear spaces, are trees positive to CTV whose isolations were not molecularly characterized; in which is shown that the space disposition of the electrophoresic pattern I (clear circle) it is mostly distributed; however, it is not evident if this dispersion pattern is carried out between trees or between rows. Another outstanding situation is that around trees eradicated in 2002 (Figure 4, square with internal cross), they are only present the

Adicionalmente, estudios previos sobre la estructura poblacional de aislamientos que porta un áfido vector (*T. citricida*) en campo, han demostrado que los haplotipos de CTV poseen baja diversidad nucleotídica y en consecuencia esto causa que la dispersión del CTV en la huerta mantenga una estructura poblacional característica (Albiach *et al.*, 2000). Lo anterior se puede explicar por la poca variabilidad detectada.

En Tamaulipas, los patrones electroforéticos obtenidos con SSCP en la huerta E1; donde, I= cuatro bandas; II= tres bandas; III= tres bandas; IV= dos bandas, V= tres bandas; VI= cuatro bandas; VII= cinco bandas; Mm= marcador de peso molecular (utilizado sólo como referencia de distancia de migración), mostraron una conformación de hasta cinco bandas, encontrándose en un aislamiento al menos tres haplotipos, categorizados en siete tipos de patrones (Figura 5).



**Figura 5. Patrones electroforéticos obtenidos por SSCP de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV en Tamaulipas, México**  
**Figure 5. Electrophoresic pattern obtained by SSCP of a portion of proteic layer (p25) of CTV isolations in Tamaulipas, Mexico.**

Las frecuencias de los patrones promedio en campo fueron las siguientes: patrón I 4/43, II 4/43, III 9/43, IV 22/43, V 2/43, VI 1/43 y VII 1/43. La frecuencia más alta correspondió al patrón IV (dos bandas, un haplotipo) de la Figura 5 y en la Figura 6 donde, I= cuatro bandas; II= tres bandas; III= tres bandas; IV= dos bandas; V= tres bandas; VI= cuatro bandas; VII= cinco bandas. Esto puede ser evidencia de que la población se está diversificando o el haplotipo predominante tiene características particulares que le confiere ventaja sobre los demás, con tendencia a mantenerse en la naturaleza.

El la Figura 7 se muestra el mapa de dispersión de aislamientos de CTV en Tamaulipas, donde los espacios en blanco indican árboles positivos sin caracterización

electrophoresic pattern I and II, the electrophoresic pattern III observed in another vegetable garden, it seems not to be related with the previous ones, then is very possible that can come from a different source.

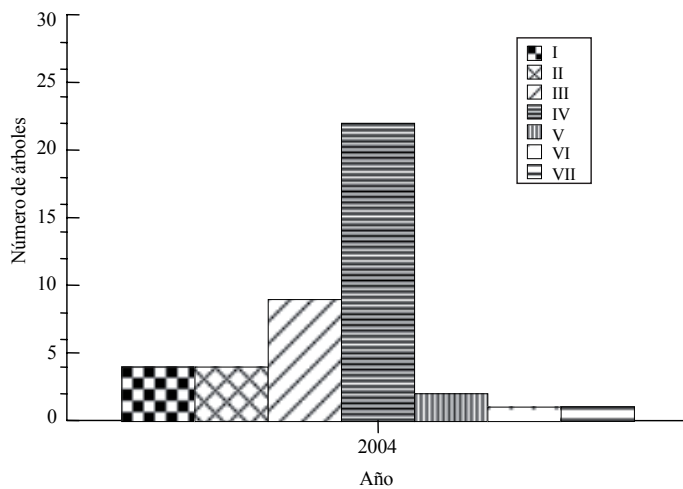
Additionally, previous studies on populational structure of isolations that carry a vectorial aphid (*T. citricida*) in field have demonstrated that CTV haplotypes have low nucleotidal diversity and in consequence this cause that CTV dispersion in the vegetable garden keeps a characteristic populational structure (Albiach *et al.*, 2000). This can be due little variability detected.

In Tamaulipas, the electrophoresic pattern obtained with SSCP in vegetable garden E1; where, I= four bands; II= three bands; III= three bands; IV= two bands, V= three bands; VI= four bands; VII= five bands; Mm= molecular weight marker (only used as reference of migration distance), showed a conformation of up to five bands, finding in an isolation at least three haplotypes, categorized in seven types of patterns (Figure 5).

The frequencies of average patterns in field were the following: pattern I 4/43, II 4/43, III 9/43, IV 22/43, V 2/43, VI 1/43 and VII 1/43. The highest frequency corresponded to pattern IV (two bands, a haplotype) of Figure 5 and in Figure 6 where, I= four bands; II= three bands; III= three bands; IV= two bands; V= three bands; VI= four bands; VII= five bands. This can be evidence that the population is diversifying or the predominant haplotype has particular characteristics that it confers him advantage on the other ones, with trend to stay in the nature.

In Figure 7 is shown dispersion map of CTV isolations in Tamaulipas, where clear spaces indicate positive trees without molecular characterization of isolation. In this an aggregation is observed starting from the row (trees) 30 to 50, with an apparent gradual dispersion in direction of the rows. The prevailing pattern (IV) is distributed along study area and seemingly associates with pattern III.

The analysis of distance to nearest positive tree and dynamics of dispersion of focuses was not conclusive, since not all positive trees were characterized at molecular level; however, in Yucatán the biggest proportion in haplotypes dispersion was to nearest neighboring trees that ara apart 5, 7 and 10 m of a positive tree of reference, even when was observed a smaller apparently random proportion dispersion.



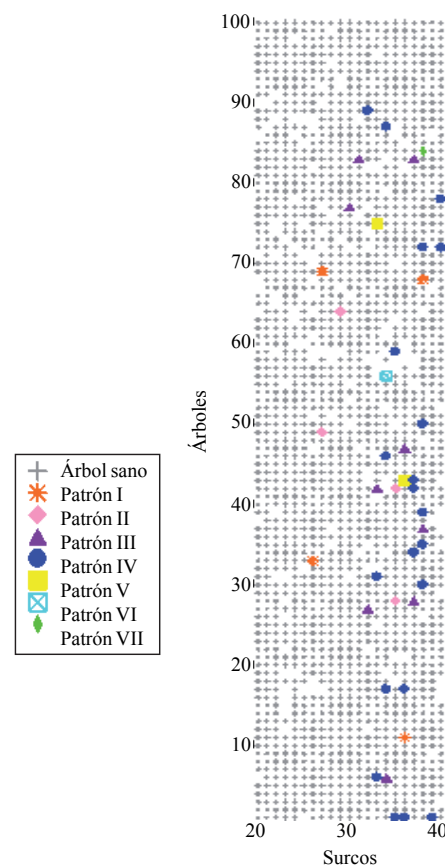
**Figura 6. Distribución de frecuencias de los patrones electroforéticos en Tamaulipas, México.**

**Figure 6. Frequencies distribution of electrophoretic patterns in Tamaulipas, Mexico.**

molecular del aislamiento. En esta se observa una agregación a partir de la hilera (árboles) 30 a 50, con una aparente dispersión gradual en dirección de las hileras. El patrón prevalente (IV) se distribuye a lo largo del área de estudio y aparentemente se asocia con el patrón III.

El análisis de la distancia al árbol positivo más cercano y la dinámica de dispersión de focos no fue concluyente, ya que no todos los árboles positivos se caracterizaron a nivel molecular; sin embargo, en Yucatán la mayor proporción en la dispersión de haplotipos fue a los árboles vecinos más cercanos que distan 5, 7 y 10 m de un árbol positivo de referencia, aun cuando se observó una menor proporción de dispersión en apariencia aleatoria.

Análisis de poblaciones de CTV en Yucatán y Tamaulipas. Los dendrogramas construidos a partir de las matrices de ausencia y presencia de bandas (no mostrados), dieron como resultado para Yucatán, un coeficiente de similitud de 0.86, observándose tres grupos. Se presentó mayor distancia genética entre el grupo 1 (patrón electroforético I) y el grupo 3 (patrón electroforético II), el grupo 2 (patrón electroforético III) que además corresponde a la huerta C1, puede ser un patrón de transición entre ambos grupos. En el dendrograma construido a partir de 43 aislamientos obtenidos de Tamaulipas, con un coeficiente de similitud de 0.8, se observaron siete grupos que correspondieron a los patrones electroforéticos caracterizados.



**Figura 7. Mapa de dispersión de aislamientos de CTV en Tamaulipas, México (2004).**

**Figure 7. Dispersion map of CTV isolations in Tamaulipas, Mexico (2004).**

Populations of CTV analysis in Yucatán and Tamaulipas. The built dendrograms starting from the absence and presence of bands (not shown) matrixes gave as a result for the case of Yucatán, a coefficient of similarity of 0.86, being observed three groups. Bigger genetic distance was presented among the group 1 (electrophoretic pattern I) and the group 3 (electrophoretic pattern II), the group 2 (electrophoretic pattern III) that also corresponds to vegetable garden C1, it can be a transition pattern between both groups. In the built dendrogram starting from 43 isolations obtained from Tamaulipas, with a coefficient of similarity of 0.8, seven groups were observed that corresponded to characterized electrophoretic patterns.

Therefore, contrary to what was expected, Tamaulipas showed bigger variability of CTV isolations, with regard to Yucatán, which can be result of diverse factors as age

Por lo tanto, Tamaulipas presentó mayor variabilidad de aislamientos de CTV, con respecto a Yucatán, lo cual puede ser diversos factores como la edad de las huertas (25-30 años), homogeneidad de las huertas (monocultivo), manejo intensivo, diversidad de variedades y combinaciones injerto/portainjerto e intercambio de material vegetativo posiblemente infectado, que al ser expuestas a infecciones múltiples del CTV, provocó cambios en la estructura poblacional de virus. Al respecto se han realizado numerosos estudios, sometidos a cambios de hospederos, áfidos vectores, condiciones climáticas y manejo, entre otras (Ayllón *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2007).

El análisis de varianza molecular (AMOVA), refuerza la idea sobre la fuente común del CTV en Yucatán y Tamaulipas, ya que se calculó 31% de variación entre las poblaciones, el mayor porcentaje de variación se observó dentro de las poblaciones (Cuadro 3), que puede ser derivado de los factores antes mencionados, además que el primer reporte de tristeza ocurrió en Tamaulipas en 1983 (SENASICA, 2010), con un periodo amplio para la diversidad aunado a la presencia de otros áfidos vectores del CTV distintos a *T. citricida*, en especial de *A. gossypii*, que participa en la dispersión de la enfermedad como ha ocurrido en España e Israel (Cambra *et al.*, 2000).

of the vegetable gardens (25-30 years), homogeneity of vegetable gardens (monoculture), intensive handling, diversity of varieties and combinations graft/rootstocks and exchange of possibly infected vegetative material, that when being exposed to multiple infections of CTV, it caused changes in populational structure of virus. In this matter have been carried out numerous studies, subjected to host changes, vectorial aphids, climatic and handling conditions, among other (Ayllón *et al.*, 2006; Sambade *et al.*, 2007; Weng *et al.*, 2007).

The analysis of molecular variance (AMOVA) reinforces the idea on the common source of CTV in Yucatán and Tamaulipas, since 31% variation was calculated between studied populations, the biggest variation percentage was observed inside the populations (Table 3) that can be derived of factors just mentioned, besides the fact that the first report of tristeza in México, was in Tamaulipas in 1983 (SENASICA, 2010) that has given a long period for amplification of the diversity together to presence of other vectorial aphids of CTV different to *T. citricida*, especially *A. gossypii* that participates in the dispersion of the disease as it has occurred in Spain and Israel (Cambra *et al.*, 2000).

**Cuadro 3. AMOVA del patrón electroforético de SSCP de muestras amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de Yucatán y Tamaulipas, México.**

**Table 3. AMOVA of electrophoresic pattern of SSCP of amplified samples from a portion of proteic layer (p25) of CTV isolations of Yucatán and Tamaulipas, Mexico.**

Fuentes de variación	GL	Estimadores de varianza	Porcentaje de variación	Significancia*
Entre poblaciones	1	0.282	31	0.3083
Dentro de poblaciones	119	0.633	69	---

GL= grados de libertad; \*= probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de  $\phi$  *stat* más extremos que los observados.

El análisis de dispersión del vecino más cercano y la dinámica de la dispersión de focos no fue concluyente debido, que no todos los árboles identificados como positivos a CTV, pudieron ser caracterizados molecularmente; sin embargo, éstas herramientas analíticas pueden ser de gran utilidad en el estudio de la dispersión de poblaciones de patógenos.

The analysis of the nearest neighbor's dispersion and the dynamics of the dispersion of focuses was not conclusive due that not all the trees identified as positive to CTV could be molecularly characterized; however, these analytic tools can be of great utility in the study of pathogens populations dispersion.

## CONCLUSIONES

Desde la llegada de *T. citricida* a México, no ha sido posible detectar cambios en la estructura poblacional del CTV atribuibles a este vector, tampoco a la sintomatología severa que se exprese en decaimiento de los árboles. Esto puede deberse que los aislamientos moderados detectados en ambas regiones estén actuando como protectores naturales.

La diversidad de la estructura poblacional en virus, es un mecanismo que evita la respuesta de resistencia del hospedero o como reserva que mantiene a los haplotipos con ventajas en otros ambientes y con habilidad para infectar numerosos hospederos; por ello y con los resultados antes descritos, se aporta información sobre algunos de los factores que contribuyen o permiten la diversidad genética viral.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el proyecto CONACYT G35488-b. Campaña contra el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) en Tamaulipas y Yucatán (DGSV), Comité de Fomento e Investigación Citrícola del Estado de Tamaulipas (CFICET); Campo Experimental Francisco Villa; Unión Agrícola Regional de Citricultores de Tamaulipas (UARCT) y Fundación Produce Tamaulipas.

## LITERATURA CITADA

- Albiach, M. R.; Guerri, J.; Hermoso de Mendoza, A.; Laigret, F.; Ballester-Olmos, J. F. and Moreno, P. 2000. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology*. 90:134-138.
- Ayllón, M. A.; López, C.; Navas-Castillo, J.; Garnsey, S. M.; Guerri, J.; Flores, R. and Moreno, P. 2001. Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CVT) RNA: Incidence of three sequences types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch. Virology*. 146:27-40.
- Ayllón, M. A.; Rubio, L.; Sentandreu, V.; Moya, A.; Guerri, J. and Moreno, P. 2006. Variations in two genes sequences of *Citrus tristeza virus* alter host passage. *Virus Genes*. 32:119-128.

## CONCLUSIONS

From arrival of *T. citricida* to Mexico, it has not been possible to detect changes in the CTV populational structure attributable to this vector, neither to the severe symptoms that is expressed in decline of the trees. This can be due that the moderate isolations detected in both regions are acting as natural protective.

The diversity of the populational structure in virus, is a mechanism that avoids the response of resistance of host or as reservation that maintains to haplotypes with advantages in other environments and with ability to infect numerous hosts; by this reason and with the results just described, information is given on some of factors that contribute or allow the viral genetic diversity.

*End of the English version*



- Cambra, M.; Gorris, M. R.; Marroquín, C.; Román, M. P.; Olmos, A.; Martínez, M. C.; Hermoso de Mendoza, A.; López, A. and Navarro, L. 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the valencian community of Spain. *Virus Res*. 71:85-95.
- Diario Oficial de la Federación (DOF). 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000. Por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos.
- d'Urso, F.; Rubio, M. A.; Ayllón, 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 Pathol.* 49:288-294.
- Gaona, G. G.; Ruiz, C. E. y Peña, M. R. 2000. Los pulgones (Homóptera: Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranja, *Citrus sinensis* (L.), en la zona centro de Tamaulipas. *Acta Zoológica Mexicana*. 81:1-12.
- Garnsey, S. M.; Gumpf, D. J.; Roistacher, C. N.; Civerolo, E. L.; Lee, R. F.; Yokomi, R. K. and Bar-Joseph, M. 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*. 19(2):151-157.

- Gottwald, T. R.; Garnsey, S. M. and Borbón, J. 1998. Increase and patterns of spread of *Citrus tristeza virus* infection in Costa Rica, and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology*. 88:621-636.
- Gottwald, T. R.; Richie, S. M. and Campbell, C. L. 1992. LCOR2- Spatial correlation analysis software for the personal computer. *Plant Dis*. 76:213-215.
- Greig, S. P. 1952. The use of random and contiguous quadrats in the study of the structures of plant communities. *Ann. Bot.* 16:293-316.
- Herrera, I. L. 2004. Caracterización biológica y molecular de aislados del virus tristeza de los cítricos (CTV) en México. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-Irapuato. 185 p.
- Jesus, J. W. C. e Bassanezi, R. B. 2004. Análise da dinâmica e estrutura de focos da Morte Súbita dos Citros. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília. 29(4):399-405.
- Kong, P.; Rubio, L.; Polek, M. and Falk, B. W. 2000. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes*. 21:139-145.
- Lloyd, M. 1967. Mean crowding. *J. Anim. Ecol.* 36:1-30.
- Loeza, K. E.; Palacios, T. E. C.; Ochoa, M. D. L.; Mora, A. G.; Gutiérrez, E. M. A.; Febres, V. J.; Moore, G. A. and Alvarez, R. R. 2005. Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *In: Hilf, M. E.; Duran, A. N. and Rocha, P. M.* (eds). Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. California, USA. 407-411p.
- Mendoza, A.; Salazar, C.; Alvarado, O.; Cruz, M. A. y Barrera, H. 2003. Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos en México. *Rev. Fitotec. Mex.* 26(4):223-230.
- Michaud, J. P. and Alvarez, R. R. 2000. First collection of brown citrus aphid, *Toxoptera citricida* (Homoptera: Aphididae) in Quintana Roo, México. *Florida Entomologist*. 83:357-358.
- Morisita, M. 1959. Measuring the dispersion of individual and analysis of distributional patterns. *Mem. Fac. Sci. Kyushu Uni. Ser. E. (Biol.)*. 2:215-235.
- Moya, A.; Elena, S. F.; Bracho, A.; Miralles, R. and Barrio, E. 1999. The evolution of RNA viruses: a population genetics view. *PNAS*. 97(13):6967-6963.
- Nolasco, G.; Fonseca, F. and Silva, G. 2007. Occurrence of genetic bottlenecks during *Citrus tristeza virus* acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. *Archives of virology* DOI 10.1007/s00705-007-1089-8.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GenA1Ex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. 6:288.
- Powell, A. G. 1991. Virus spread and vector dynamics in genetically diverse plant populations. *Ecology*. 72(1):232-241.
- Powell, C. A. and Lin, Y. 2005. Separation of *Citrus tristeza virus* isolates in mixed infections through transfer by single brown citrus aphids. *Hortscience*. 40:694-696.
- Rivas, V. P.; Loeza, K. E.; Mora, A. G.; Febres, V.; Ochoa, M. D.; Gutiérrez, E. M. A.; Cintra de Jesus, J. W.; Correia, M. C. y Arno, W. N. 2008. Estructura poblacional de aislamientos del *Citrus tristeza virus* y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil. *Agrociencia*. 42:85-93.
- Rubio, L.; Ayllón, M. A.; Kong, P.; Fernández, A.; Polek, M. L.; 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. *J. Virol.* 75:8054-8062.
- Ruiz, G. N. 2008. Detección, dispersión y muestreo en la erradicación del *Citrus tristeza virus* en plantaciones comerciales de cítricos. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados. Texcoco, México. 105 p.
- Ruiz, G. N.; Mora, A. G.; Rivas, V. P.; Góngora, C. C.; Loeza, K. E.; Ochoa, M. D.; Ramírez, V. G.; Gutiérrez, E. A. y Álvarez, R. R. 2009. Sensibilidad de inmunopresión-ELISA y DAS-ELISA en el diagnóstico del virus tristeza de cítricos en Tamaulipas, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*. 15(1):41-47.
- Sambade, A.; Ambrós, S.; López, C.; Ruíz-Ruiz, S.; Hermoso de Mendoza, A.; Flores, R.; Guerri, J. and Moreno, P. 2007. Preferential accumulation of severe variants of *Citrus tristeza virus* in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch. Virol.* DOI 10.1007/s00705-006-0932-7.

- Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2010. URL: <http://mail2.senasica.gob.mx/default.asp?id=1010>.
- Sentandreu, V.; Castro, J. A.; Ayllón, M. Z.; Rubio, L.; Guerri, J.; González, C. G. and Moya, A. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in *Citrus tristeza virus* after host passage. *Arch. Virol.* 151:875-894.
- Silva, V. S.; Peña del Río, M. A.; Peña, M. R.; Villegas, J. N.; Byerly, M. K. y Rocha, P. M. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia.* 35:441-450.
- Weng, Z.; Barthelson, R.; Gowda, S.; Hilf, M. E.; Dawson, W. O. and Xiong, Z. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLOS ONE* 2(9):917. doi:10.1371/journals.pone.0000917.
- Yokomi, R. A.; Lastra, R.; Stoetzel, M. B.; Damsteet, V. D.; Lee, R. F.; Garnsey, S. M.; Gottwald, T. R.; Rocha-Peña, M. A. and Niblett, C. L. 1994. Establishment of brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87:1078-1085.