

SEROLOGICAL AND MOLECULAR TOOLS FOR STRAIN DISCRIMINATION OF *Citrus tristeza virus* ISOLATES FROM NUEVO LEÓN, MÉXICO

HERRAMIENTAS SEROLÓGICAS Y MOLECULARES PARA LA DISCRIMINACIÓN DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, MÉXICO

María M. Iracheta-Cárdenas¹, Isidro H. Almeyda-León², Bayarm Cevik³, Charles L. Niblett⁴, Richard F. Lee⁵, Mario A. Rocha-Peña^{2*}

¹Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba s/n. Cd. Universitaria. San Nicolás de los Garza, Nuevo León.

²Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular, INIFAP/UANL. Apartado Postal 128-F. 66450. Cd. Universitaria. 66450. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. (mrocha@fcb.uanl.mx). ³Faculty of Agriculture. Department of Plant Protection. Süleyman Demirel University. 32260. Isparta, Turkey. ⁴Horticultural Sciences Department, University of Florida, P. O. Box 110780, Gainesville, FL 32611-0780 USA. ⁵National Clonal Germplasm Repository for Citrus and Dates, USDA-ARS.1060 Martin Luther King Blvd. Riverside, California 92507. USA.

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV) is an important issue to the Mexican citrus industry. CTV infected plants have been reported in 20 citrus producing states of the country as symptomless virus infections, even on plants grafted on the sensitive sour orange rootstock. The detection of severe CTV isolates is mandatory to reinforce the operation of the CTV campaign nationwide. In this study, 13 CTV isolates from Nuevo León and one from Tamaulipas states were characterized for activity against the strain discriminatory MCA13 monoclonal antibody, bi-directional (BD) PCR, and hybridization with specific DNA probes, with RT-PCR amplicons, of the p25 coat protein gene. Ten out of 13 CTV isolates from Nuevo León and the Tamaulipas isolate gave a positive reaction to the MCA13 monoclonal antibody. BD-PCR tests yielded a cDNA fragment of 300 bp characteristic of decline-inducing CTV strains with eight of 13 isolates from Nuevo León and the Tamaulipas isolate. Hybridization with strain group specific DNA probes showed reactivity of eight CTV isolates with Probe II associated with decline inducing CTV strains, and three CTV isolates with Probe VII, associated to mild CTV strains. As a conclusion, it was shown the usefulness of the MCA13 monoclonal antibodies, BD-PCR and the hybridization with strain group specific DNA probes (SGSP) for the discrimination of CTV isolates, and the discovering of severe CTV isolates in the state of

ABSTRACT

El virus de la tristeza (*Citrus tristeza virus* = CTV) es un problema de importancia para la industria citrícola mexicana. Se han reportado plantas infectadas por el CTV en 20 estados productores de cítricos del país, en forma de infecciones asintomáticas, incluso en plantas injertadas en el patrón hipersensible naranjo agrio. La detección de aislamientos severos de CTV es necesaria para reforzar la operación de la campaña de CTV en todo el país. En el presente estudio se caracterizaron 13 aislamientos del CTV del estado de Nuevo León y uno del estado de Tamaulipas por su actividad contra el anticuerpo monoclonal MCA13, PCR bi-direccional (BD) e hibridación con sondas específicas para el gen p25 de la proteína de cápside. Diez de 13 aislamientos del CTV de Nuevo León y el aislamiento de Tamaulipas dieron una reacción positiva al anticuerpo monoclonal MCA 13. Las pruebas BD-PCR dieron un fragmento de ADNc de 300 pares de bases característico de razas tipo decaimiento en ocho de los 13 aislamientos de Nuevo León y del aislamiento de Tamaulipas. En la hibridación con sondas ADN específicas, dieron reacción con ocho aislamientos (CTV) con la Sonda II asociada con linajes CTV del tipo decaimiento y tres aislamientos mostraron reactividad con la Sonda VII asociada con linajes de tipo débil. Como conclusión, se mostró la utilidad del anticuerpo monoclonal MCA13, del PCR bi-direccional y de la hibridación con sondas específicas de (SGSP) para la discriminación de aislamientos de CTV, así como el descubrimiento de aislamientos severos de CTV en el estado de Nuevo León. Tanto el PCR-BD y la hibridación con sondas específicas (SGSP) fueron más adecuados para la

*Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: September, 2009. Approved: April, 2010.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 44: 449-460. 2010.

Nuevo León. Both BD-PCR and hybridization with SGSP were more suitable for strain discrimination of CTV isolates, than the MCA13 monoclonal antibody. BD-PCR was able to detect mixtures of both mild and decline inducing CTV isolates in the sample; hybridization with SGSP was suitable for detecting either mild, decline inducing and stem pitting CTV isolates.

Key words: bi-directional PCR, DIBA, hybridization, MCA 13 monoclonal antibody.

INTRODUCTION

Citrus tristeza virus (CTV) is distributed worldwide and it is the causal agent of the most economically important viral disease of citrus (Rocha-Peña *et al.*, 1995a). It has been documented (Garnsey *et al.*, 2005) that CTV occurs in the field as a mixture of strains or isolates which differ in biological properties, such as symptoms in the field (Rocha-Peña *et al.*, 1995a), reaction on indicator plants (Garnsey *et al.*, 2005) and aphid transmissibility (Rocha-Peña *et al.*, 1995b; Yokomi *et al.*, 1994). This phenomenon frequently leads to apparent latent infections of diverse CTV isolates for many years, even in plants grafted on the sensitive sour orange rootstock without any noticeable disease symptoms (Bar-Joseph, 1978; Rocha-Peña *et al.*, 1998). Over the years, the occurrence of unexpected declining CTV infected trees in the field may result if no phytosanitary measures are accomplished against the virus on a timely basis (Rocha-Peña *et al.*, 1998).

Several serological and molecular approaches have been developed as an effort to differentiate CTV isolates (Niblett *et al.*, 2000). These approaches include the use of the strain discriminatory MCA 13 monoclonal antibody (Permar *et al.*, 1990), serological probes for orange stem pitting CTV isolates (Nikolaeva *et al.*, 1998) single strand conformation polymorphism (SSCP) addressed to several CTV genes (Niblett *et al.*, 2000), bidirectional PCR (Cevik *et al.*, 1996), several hybridization approaches with specific group DNA probes (Cevik, 1997^[6]; Narváez *et al.*, 2000), and several approaches using restriction analysis patterns

discriminación de la aislamientos de CTV, que el anticuerpo monoclonal MCA13. El PCR-BD pudo detectar mezclas de aislamientos débiles y del tipo decaimiento del CTV en una misma muestra; la hibridación con SGSP fue adecuada para detectar aislamientos CTV ya sea de tipo débil, tipo decaimiento y picado de tallo.

Palabras clave: PCR bi-direccional, DIBA, hibridación, anticuerpo monoclonal MCA 13.

INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*) CTV es de distribución mundial y es el agente causal de la enfermedad viral de mayor importancia económica de los cítricos (Rocha-Peña *et al.*, 1995a). Se ha documentado (Garnsey *et al.*, 2005) que el CTV ocurre en el campo en forma de mezcla de razas o aislamientos que difieren en sus propiedades biológicas, tales como síntomas en el campo (Rocha-Peña *et al.*, 1995a), reacción en plantas indicadoras (Garnsey *et al.*, 2005) y transmisibilidad por áfidos (Rocha-Peña *et al.*, 1995b; Yokomi *et al.*, 1994). Este fenómeno conduce con frecuencia a infecciones latentes de diversos aislamientos de CTV por años, incluso en plantas injertadas sobre el patrón hipersensible de naranjo agrio, sin ningún síntoma evidente de la enfermedad (Bar-Joseph, 1978; Rocha-Peña *et al.*, 1998). Si no realizan medidas fitosanitarias oportunas contra el virus, en el transcurso del tiempo, se puede presentar la ocurrencia inesperada de árboles infectados con CTV decaimiento en el campo (Rocha-Peña *et al.*, 1998).

Se han desarrollado varios métodos con bases serológicas y moleculares como un esfuerzo para diferenciar aislamientos de CTV (Niblett *et al.*, 2000). Estos métodos incluyen el uso del anticuerpo monoclonal MCA 13 de raza discriminadora (Permar *et al.*, 1990), sondas serológicas para la detección de aislamientos de CTV del tipo picado de tallo (Nikolaeva *et al.*, 1998), polimorfismo de conformación de cadena simple (SSCP) dirigidos a varios genes del CTV (Niblett *et al.*, 2000), PCR bidireccional (Cevik *et al.*, 1996), varias técnicas de hibridación con sondas específicas (Cevik, 1997^[6],

⁶ Cevik, B. 1997. Molecular differentiation of strains of *Citrus tristeza virus* using the coat protein gene sequences. MSc. Thesis. University of Florida. Gainesville. 112 p.

with RT-PCR amplicons (Marques *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2003), among others.

In México, CTV occurs as symptomless virus infections, even in plants grafted on sour orange rootstock (Rocha-Peña *et al.*, 2005); however, the occurrence of severe CTV isolates was determined by Silva-Vara *et al.* (2001). The citrus industry of México is considered to be at immediate risk of CTV epidemics because sour orange is the predominant rootstock throughout the country and the presence of the most efficient vector, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), commonly called the brown citrus aphid (Rocha-Peña *et al.*, 2005; SAGARPA, 2006). The objectives of this study were to evaluate some of the molecular methods available and to determine whether some CTV isolates collected from Nuevo León and Tamaulipas states, México, are mild or severe.

MATERIALS AND METHODS

Thirteen CTV isolates collected from orange trees in the state of Nuevo León, (Silva-Vara *et al.*, 2001) and one originally collected from the neighbouring state of Tamaulipas (González-Garza, 1983^[7]) (Table 1) were individually maintained *in planta* in at least two Mexican lime (*C. aurantifolia*) plants. Citrus samples were used either as fresh or dry tissue. Dry citrus tissue of type CTV isolates T36, T66 (declining, MCA+) and T55 (mild, MCA13-) from Florida (Permar *et al.*, 1990; Rocha-Peña *et al.*, 1995b) were used as positive controls, for decline and mild isolates.

Serological strain discrimination

Serological reactivity of citrus extracts from plants infected with CTV isolates was evaluated against the strain discriminatory MCA13 monoclonal antibody in dot-immunobinding assay (DIBA) (Rocha-Peña *et al.*, 1991). The MCA13 monoclonal antibody, from Nokomis Corp. (Florida, USA), was used at a 1:5000 (v/v) dilution and goat anti-mouse IgG labeled with alkaline phosphatase (SIGMA A-3688) at 1:30000 (v/v). A duplicate of the membranes containing the extracts of CTV infected and healthy citrus samples were run aside by using the CTV specific rabbit C3 antibodies (0.2 mg mL⁻¹) (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008);

Narváez *et al.*, 2000) y varias técnicas de análisis de restricción con productos de amplificación de RT-PCR (Marques *et al.*, 2006; Roy *et al.*, 2003), entre otros.

En México, el CTV ocurre como infecciones asintomáticas, incluso en plantas injertadas sobre patrón de naranjo agrio (Rocha-Peña *et al.*, 2005); sin embargo, se determinó la ocurrencia de aislamientos del CTV severo (Silva-Vara *et al.*, 2001). Se considera que la industria citrícola de México está en riesgo inmediato de epifitias por el CTV debido al uso de naranjo agrio como patrón predominante en el país y por la presencia del vector más eficiente, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), comúnmente conocido como pulgón café de los cítricos (Rocha-Peña *et al.*, 2005; SAGARPA, 2006). Los objetivos del presente estudio fueron evaluar algunos de los métodos moleculares disponibles y determinar si algunos de los aislamientos del CTV de los estados de Nuevo León y de Tamaulipas, México, son débiles o severos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Trece aislamientos de CTV de árboles de naranjo en el estado de Nuevo León, (Silva-Vara *et al.*, 2001) y uno

Table 1. *Citrus tristeza virus* isolates from Nuevo León and Tamaulipas, México.

Cuadro 1. Aislamientos del virus tristeza de Nuevo León y Tamaulipas, México.

Origin	Field code	Sample ID
Montemorelos, Nuevo León	M L41-7	MX01
Montemorelos, Nuevo León	M L12-8	MX02
Montemorelos, Nuevo León	M L48-8	MX03
Montemorelos, Nuevo León	M L38-8	MX04
Montemorelos, Nuevo León	M L33-4	MX05
Montemorelos, Nuevo León	M L26-10	MX06
Linares, Nuevo León	M L50-4	MX07
Linares, Nuevo León	L L05-14	MX08
Linares, Nuevo León	L L1-11	MX09
Linares, Nuevo León	L L3-12	MX10
Linares, Nuevo León	L L4-23	MX11
Linares, Nuevo León	L L8-3	MX12
Montemorelos, Nuevo León	M L33-13	MX13
Guémez, Tamaulipas	CIEFV	MX14

⁷ González-Garza, R. 1983. Identificación y control de las virosis de los cítricos en los estados de Nuevo León y Tamaulipas. Informe de Labores. CAEGE/INIA/SARH. Convenio Cooperativo de Investigación en Virología Vegetal INIFAP-UANL. Monterrey, Nuevo León, México (Mimeo). 175 p.

goat anti-rabbit enzyme conjugate (Sigma A-8025) was used at 1:30000 (v/v) dilution.

Nucleic acid extraction

RNA extraction was performed according to the method of Pappu *et al.* (1993). Infected tissue (250 mg) was ground to powder with liquid nitrogen and homogenized with 500 μ L of TES buffer [0.1 M Tris HCl, pH 8.0; 2 % SDS (w/v); 2 mM EDTA], 250 μ L phenol, 250 μ L of a solution of chloroform-isoamyl alcohol (24:1). Then it was heated at 70 °C for 5 min, and centrifuged at 5000 rpm in a clinical centrifuge with a swinging bucket rotor (CCSBR), at 4 °C during 5 min. The supernatant was then placed into a Sephadex G-100-50 column, the column was centrifuged again in a CCSBR at 1500 rpm during 4 min at 4 °C, and the extract was recuperated in a microcentrifuge tube.

Reverse transcription (RT) and polymerase chain reaction (PCR)

The RT-PCR components were run in a final volume of 25 μ L as follows: 2.5 μ L PCR mix 10X, 0.75 μ L $MgCl_2$ (1.5 mM), 2.5 μ L of dithiothreitol (0.1 M), 2.0 μ L (25 picomols) of each CN119 (5'-AGATCTACCATGGACGACGAAACAAAG-3') /CN120 (5'-GAATTCGCGGCCCGTCAACGTGTGTTAAATTCC-3') primers, 1.0 μ L AMLV reverse transcriptase (200 units), 0.5 μ L Taq DNA polymerase (2.5 units), 0.5 μ L RNasin, 5 μ L of the viral RNA extract, 2.0 μ L dNTP's (200 μ M) and 6.25 μ L of bidistilled water. The thermal programme was one cycle of 45 min at 42 °C, followed by 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension of 10 min at 72 °C. The combination of CN119/CN120 primers yields a product size of approximate 700 bp.

Bidirectional polymerase chain reaction

Bidirectional PCR (BD-PCR) was conducted according to Cevik *et al.* (1996). The protocol consists of one single two steps RT-PCR runs with two external (CN118 and CN 119) and two internal [CN218 (5'-TTTGGACTGACGTCGTGTT-3') and CN219 (5'-TTCGTCGACGACGACAGGTA-3')] set of primers. BD-PCR cocktail mixture and thermal program were conducted according to Cevik *et al.* (1996). The combination of CN218/CN120 and CN119/CN219 yield product sizes of approximate 300 and 400 bp, for decline inducing and mild CTV strains, (Cevik *et al.*, 1996).

originalmente recolectado en el estado de Tamaulipas (González-Garza, 1983^[7]) (Cuadro 1) se mantuvieron en cultivos *in planta* en por lo menos dos plantas de limón mexicano (*C. aurantifolia*). Se usaron muestras de cítricos de tejido fresco o seco. Como testigos positivos se usaron muestras de tejido desecado infectado con los aislamientos T36 y T66 (decaimiento, MCA+) y T55 (débil, MCA 13-) de Florida (Permar *et al.*, 1990; Rocha-Peña *et al.*, 1995b) para aislamientos del tipo decaimiento y débil.

Discriminación serológica de aislamientos

Se evaluó la reactividad serológica de extractos de plantas infectadas con aislamientos de CTV contra el anticuerpo monoclonal MCA13 en pruebas de inmuno-adherencia a membranas de nitrocelulosa (DIBA) (Rocha-Peña *et al.*, 1991). El anticuerpo monoclonal MCA13 adquirido de Nokomis Corp. (Florida, EE.UU.) se usó en una dilución de 1:5000 (v/v) y el anticuerpo de cabra anti IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina (SIGMA A-3688) se usó en una dilución de 1:30000 (v/v). Se corrió un duplicado de las membranas con extractos de muestras de cítricos sanos e infectados con el CTV usando los anticuerpos C3 de conejo anti-CTV (0.2 mg mL⁻¹) (Iracheta-Cárdenas *et al.*, 2008); se usó el conjugado enzimático cabra anti-conejo (Sigma A-8025) en una dilución 1:30000 (v/v).

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de RNA se realizó con el método de Pappu *et al.* (1993). Tejido infectado (250 mg) se molió con nitrógeno líquido y homogeneizó con 5 μ L de solución amortiguadora TES [0.1 M Tris HCl, pH 8.0; 2 % SDS (p/v); 2 mM EDTA], 250 μ L de fenol, 250 μ L de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Luego se calentó a 70 °C por 5 min, y centrifugó a 5000 rpm en una centrifuga clínica con un rotor de columpio (CCSBR) a 4 °C por 5 min. El sobrenadante se colocó en una columna de Sephadex G-100-50, se centrifugó de nuevo en un CCSBR a 1500 rpm por 4 min a 4 °C y el extracto se recuperó en un tubo de microcentrifuga.

Reverso transcripción (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los componentes de la RT-PCR se corrieron en un volumen final de 25 μ L como sigue: 2.5 μ L de la mezcla 10X de PCR, 0.75 μ L $MgCl_2$ (1.5 mM), 2.5 μ L de ditiotritol (0.1 M), 2.0 μ L (25 picomols) de cada uno de los iniciadores CN119 (5'-AGATCTACCATGGACGACGAAACAA

Hybridization with strain group specific DNA probes

Molecular hybridization was conducted according to Cevik, 1997) and Halbert *et al.* (2003) with a set of specific DNA probes that have unique sequences for a strain discrimination of CTV isolates. The unique sequences of these strain specific probes are the subject of U.S. Patent # 6140046 (USP, 2000). Probe 0 contains a nucleotide sequence conserved in the CP gene of all known strains of CTV and hence it is a universal probe for CTV. Probe I hybridizes with decline-inducing strains; Probes II, III, IV and V hybridize with different groups of stem-pitting strains from various geographical origins throughout the world; Probes VI and VII hybridizes with mild strains from Florida and from Orient countries; Probe VIII hybridizes with all mild strains (Niblett *et al.*, 2000). The cDNA from the well characterized T36 (decline on plants grafted on sour orange, seedling yellows), T30 (mild strains from Florida), B53, B185, B249 (decline on plants grafted on sour orange, seedling yellows, stem pitting on grapefruit or sweet orange or both), CTV isolates (Niblett *et al.*, 2000) was used as control. The amplified PCR products of the p25 gene of each CTV isolate was blotted on nylon membranes and assayed by hybridization using the CTV strain group specific probes labeled at the 5' end with biotin to react with a streptavidin conjugated alkaline phosphatase for detection of the hybridized amplicons by chemiluminescence (Cevik, 1997).

RESULTS AND DISCUSSION

The serological test performed with the C3 rabbit polyclonal antibodies gave a positive reaction with all the CTV isolates evaluated. CTV isolates T36 and T66 (decline) and T55 (mild) from Florida used as positive controls, gave positive reactions with the C3 rabbit polyclonal antibodies also (Table 2). The tests performed with the specific strain MCA13 monoclonal antibody gave a positive reaction with CTV isolates MX01 through MX07, MX11, MX13, MX14, and with the decline CTV isolates T36 and T66 CTV from Florida. The MCA 13 monoclonal antibody gave a negative reaction with CTV isolates MX08, MX09, MX10, and MX12 from México and with the mild CTV isolate T55 from Florida. No positive reaction was obtained with healthy controls in either test (Table 2).

The RT-PCR yielded an expected 700 bp cDNA fragment for all the CTV isolates from México. The same 700 bp cDNA fragment was also obtained for

AG-3')/CN120 (5'-GAATTCGCGGCCCGTCAACGTG-TGTTAA ATTCC-3'), 1.0 μ L AMLV reverso transcriptasa (200 unidades), 0.5 μ L de Taq ADN polimerasa (2.5 unidades), 0.5 μ L de RNasin, 5 μ L del extracto ARN viral, 2.0 μ L de dNTP's (200 μ M) y 6.25 μ L de agua bidestilada. El programa térmico fue: un ciclo de 45 min a 42 °C, luego 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C, 1 min a 72 °C, y una extensión final de 10 min a 72 °C. La combinación de iniciadores CN 119/CN120 produce un fragmento de un tamaño aproximado de 700 pb.

Reacción en cadena de la polimerasa bidireccional

La PCR bidireccional (PCR-BD) se hizo de acuerdo a Cevik *et al.* (1996). El protocolo consiste en dos pasos de RT-PCR y se ejecuta con dos juegos de iniciadores externos (CN118 y CN 119) y dos pares internos [CN218 (5'-TTTGGACTGACGTCGTGTT-3') y CN219 (5'-TTCGTCGACGACGACAGGTA-3')]. La mezcla coctel PCR-BD y el programa térmico se realizaron de acuerdo a Cevik *et al.* (1996). La combinación de CN218/CN120 y CN119/CN219 produce fragmentos con tamaños de alrededor de 300 y 400 pb, para aislamientos de los tipos decaimiento y débil (Cevik *et al.*, 1996).

Hibridación con sondas de ADN de grupos específicos

La hibridación molecular se realizó de acuerdo a Cevik (1997) y Halbert *et al.* (2003) con un juego de sondas específicas que tienen secuencias únicas para una discriminación de razas del CTV. Las secuencias de estas sondas están contenidas en la patente No. 6140046 (USP, 2000). La Sonda 0 contiene una secuencia de nucleótidos conservada en el gen de la CP de todas las razas conocidas del CTV y por tanto es una sonda universal para CTV. La Sonda I hibridiza con razas del tipo decaimiento inductoras de decaimiento; las Sondas II, III, IV y V hibridizan con razas del tipo picado de tallo de orígenes geográficos diversos de todo el mundo; las Sondas VI y VII hibridizan con razas débiles de Florida y de países orientales; la Sonda VIII hibridiza con todas las razas débiles del CTV (Niblett *et al.*, 2000). Se usó como testigo positivo ADNc de los aislamientos CTV bien caracterizados: T36 (decaimiento en plantas injertadas sobre naranjo agrio, amarillamiento de plántulas), T30 (razas débiles de Florida), B53, B185, B249 (decaimiento en plantas injertadas sobre naranjo agrio, amarillamiento de plántulas, picado de tallo en plantas de naranja o toronja, o en ambas) (Niblett *et al.*, 2000). Los productos amplificados (PCR) del gen p25 de cada aislamiento (CTV) se transfirieron a membranas de nylon y se hibridaron con las sondas (CTV) específicas de grupo, las cua-

Table 2. Serological test and bidirectional PCR (BD-PCR) for strain discrimination of *Citrus tristeza virus* isolates from México. Cuadro 2. Prueba serológica y PCR-bidireccional (BD) para la separación de razas de aislamientos de *Citrus tristeza virus* de México.

Sample ID	Dot-immunobinding assay		BD-PCR	
	C3 antibody [†]	MCA13 [†]	300bp [‡]	400bp [‡]
MX01	+	+	+	—
MX02	+	+	+	—
MX03	+	+	+	—
MX04	+	+	+	—
MX05	+	+	+	—
MX06	+	+	+	—
MX07	+	+	+	—
MX08	+	—	+	+
MX09	+	—	—	+
MX10	+	—	NT [§]	NT
MX11	+	+	NT	NT
MX12	+	—	NT	NT
MX13	+	+	—	+
MX14	+	+	+	+
T36 (declining)	+	+	+	—
T66 (declining)	+	+	+	—
T55 (mild)	+	—	—	+
Healthy Control 1	—	—	—	—
Healthy Control 2	—	—	—	—

[†]Positive (+) or negative (—) reaction to serological probes. [‡]Presence (+) or absence (—) of 300 and 400 bp cDNA amplicons, respectively. [§] NT: not tested ❖ [†]Reacción positiva (+) o negativa (—) a pruebas serológicas. [‡]Presencia (+) o ausencia (—) de fragmentos de cDNA de 300 y 400 pares de base, respectivamente. [§]NT: no probada.

the decline isolates T36, T66 and the mild isolate T55 CTV from Florida used as positive controls (data not shown). When the BD-PCR (Figure 1) was performed, a cDNA fragment of 300 bp characteristic of decline of CTV isolates (MCA 13+) was obtained with isolates MX01 through MX08, MX13 and MX14, also, with Florida decline isolates T36 and T66 included as a control. A cDNA fragment of 400 bp cDNA characteristic of mild isolates of CTV (MCA 13—) was obtained with samples MX08, MX09, and MX14 from México and also with mild isolate T55 from Florida (Table 2).

The detection of both 400 and 300 bp amplicons in samples MX08 and MX14 can be interpreted as a mix-infection of both mild and decline inducing CTV isolates in the same sample. The occurrence of mix-infection of several CTV isolates is a common phenomenon in field samples (Brlansky *et al.*, 2003) and has been reported with the use of BD-PCR (Cevik *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2004; Korkmaz *et al.*, 2008).

The BD-PCR system for strain discrimination was developed on the basis of differences at position

les estaban marcadas en el extremo 5' con biotina para reaccionar con el conjugado enzimático de estreptavidina y fosfatasa alcalina y ser detectados mediante quimioluminiscencia (Cevik, 1997).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba serológica realizada con los anticuerpos C3 de conejo dio una reacción positiva con todos los aislamientos de CTV evaluados. Los aislamientos T36 y T66 (decaimiento) y T55 (débil) del CTV de Florida usados como testigos positivos, también dieron reacciones positivas con los anticuerpos C3 de conejo (Cuadro 2). Las pruebas realizadas con el anticuerpo monoclonal MCA13 dieron una reacción positiva con los aislamientos MX01 a MX07, MX11, MX13, MX14, y con los aislamientos T36 y T66 tipo decaimiento de Florida. El anticuerpo monoclonal MCA13 dio una reacción negativa con los aislamientos MX08, MX09, MX10 y MX12 de México y con el aislamiento de CTV débil de Florida. No se obtuvo reacción positiva con los testigos sanos en ninguna de las pruebas (Cuadro 2).

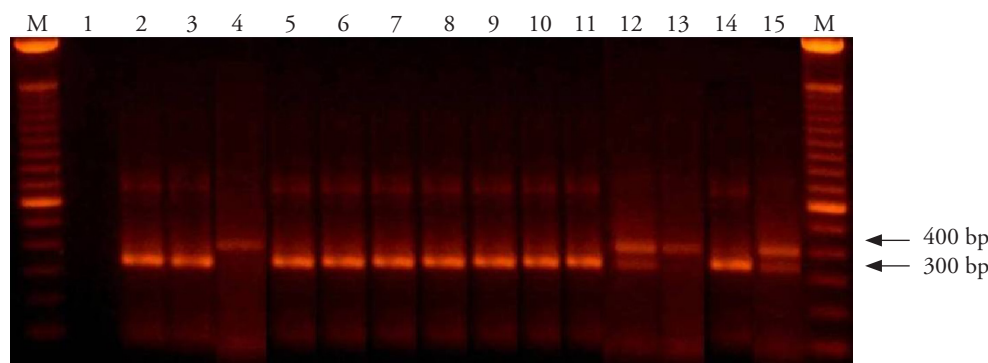


Figure 1. Bi-directional PCR for strain discrimination of *Citrus tristeza virus* isolates from Nuevo León, México. M, Molecular markers (ladder 100). 1, Citrus tissue healthy control; 2, CTV T36 (declining, MCA13+); 3, CTV T66 (declining, MCA13+); 4, CTV T55 (mild, MCA13-); 5, -MX01; 6, -MX02; 7, MX03; 8, MX04; 9, MX05; 10, MX06; 11, MX07; 12, MX08; 13, MX09; 14, MX12; 15, MX14 (see Table 1, and Materials and Methods for details).

Figura 1. PCR-bidireccional para análisis de severidad de aislamientos del virus de la tristeza de los cítricos de Nuevo León, México. M, Marcadores moleculares (ladder 100). 1, Testigo de tejido sano; 2, CTV T36 (MCA13+ tipo declinamiento); 3, CTV T66 (MCA13+ tipo declinamiento); 4, CTV T55 (tipo débil, MCA13-); 5, -MX01; 6, -MX02; 7, MX03; 8, MX04; 9, MX05; 10, MX06; 11, MX07; 12, MX08; 13, MX09; 14, MX12; 15, MX14 (ver Cuadro 1 y Materiales y Métodos para los detalles).

371 of the p25 coat protein gene of MCA13 reacting (+) decline inducing or stem-pitting severe and mild (MCA13-) CTV isolates (Cevik *et al.*, 1996). Severe CTV isolates yield a 300 bp amplicons, while mild CTV isolates produce 400 bp amplicons (Cevik *et al.*, 1996). The BD-PCR has been used in some extent for strain discrimination purposes of CTV isolates (Huang *et al.*, 2004; Kormaz *et al.*, 2008; Nibblet *et al.*, 2000). There are some other RT-PCR based systems for detection of CTV isolates (Hung *et al.*, 2000; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009); however, the use of real-time PCR reported for strain discrimination of CTV isolates (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) is relatively expensive and involves several different regions in the CTV genome, other than the p25 coat protein gene. Likewise, the use of RT-PCR in a single step reported by Hung *et al.* (2000) do not discriminate between mild from severe isolates.

The tests conducted with strain group specific biotin-labeled DNA probes are shown in Table 3. All CTV isolates tested positive with the Probe 0 universal for all CTV isolates. Likewise, cDNA from T36, B53, B185, T3, B249, and T30, used as reference, reacted positively with their corresponding strain specific probes (Table 3). The CTV isolates MX02 through MX07, and MX10 reacted with

La RT-PCR produjo el fragmento de ADNc esperado de 700 pb para todos los aislamientos de CTV de México. También se obtuvo el mismo fragmento ADNc 700 pb para los aislamientos T36 y T66 del tipo decaimiento y el aislamiento tipo débil T55 de Florida usados como testigos positivos (datos no mostrados). Cuando se realizó la PCR-BD (Figura 1) se obtuvo un fragmento de 300 pb característico de aislamientos del tipo decaimiento (MCA 13+) con los aislamientos MX01 a MX08, MX13 y MX14, así como también con los aislamientos tipo decaimiento T36 y T66 de Florida incluidos como testigo. Se obtuvo un fragmento ADNc de 400 pb característico de aislamientos de tipo débil (MCA 13-) con muestras MX08, MX09 y MX14 de México y también con un aislamiento T55 del tipo débil de Florida (Cuadro 2).

La detección de fragmentos de 400 y 300 pb en las muestras MX08 y MX14 puede interpretarse como una infección combinada de aislamientos del tipo decaimiento y débil. La ocurrencia de infecciones combinadas de varios aislamientos de CTV es un fenómeno común en muestras de campo (Brlansky *et al.*, 2003) y ha sido reportado con el uso de PCR-BD (Cevik *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 2004; Korkmaz *et al.*, 2008).

Probe II. The CTV isolates MX08, MX11 and MX12 reacted with Probe VIII and CTV isolate MX 13 reacted with both Probe VI and VIII. CTV isolate MX14 reacted with Probe V. The Probe VII specific to CTV isolates from Asiatic countries was not included in this study.

According to these results, the reaction of samples MX02 through MX07, and MX10 from Nuevo León with Probe II identified the presence of decline inducing CTV isolates in the samples analyzed. The reaction of sample MX14 with Probe V indicated the presence of a stem-pitting isolate in the CTV sample originally collected in Tamaulipas.

The strain group specific biotin-labeled DNA probes were designed on the basis of differences in the nucleotide sequences of the coat protein p25 gene

Table 3. Reactivity of *Citrus tristeza virus* isolates from México to strain group specific DNA probes.

Cuadro 3. Reactividad de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de México con sondas de ADN específicas de grupos.

Sample ID	Hybridization with strain group specific probes [†]							
	0	I	II	III	IV	V	VI	VIII
T36	5	5	0	0	0	0	0	0
B53	5	0	5	0	0	0	0	0
B185	5	0	0	5	0	0	0	0
T3	5	0	0	0	5	0	0	0
B249	5	0	0	0	0	5	0	0
T30	5	0	0	0	0	0	5	5
MX01	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MX02	4	0	5	0	0	0	0	0
MX03	5	0	5	0	0	0	0	0
MX04	4	0	5	0	0	0	0	0
MX05	5	0	5	0	0	0	0	0
MX06	2	0	2	0	0	0	0	0
MX07	4	0	4	0	0	0	0	0
MX08	4	0	0	0	0	0	0	5
MX09	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
MX10	4	0	4	0	0	0	0	0
MX11	2	0	0	0	0	0	0	4
MX12	4	0	0	0	0	0	0	5
MX13	4	0	0	0	0	0	5	5
MX14	4	0	0	0	0	5	0	0

[†] Hybridization assessments were made on a visual 1 to 5 scale for the intensity in the reaction of the different samples: 0=no hybridization; 1=weak hybridization; 5=strong hybridization. NT: not tested

† Las evaluaciones de hibridación se hicieron sobre una escala visual de 1 a 5 para la intensidad en la reacción de las diferentes muestras: 0=ninguna hibridación; 1=hibridación débil; 5=hibridación fuerte. NT: no probada.

El sistema PCR-BD para discriminación de razas del CTV (Cevik *et al.*, 1996) se desarrolló con base en diferencias en la posición 371 del gen p25 de la proteína de cápside del virus en aislamientos tipo decaimiento y picado de tallo (MCA13+) y aislamientos del tipo débil (MCA13-). Los aislamientos de CTV severo producen fragmentos de 300 pb, mientras que los aislamientos CTV débil producen fragmentos de 400 pb (Cevik *et al.*, 1996). La PCR-BD se ha usado en cierta medida para la discriminación de razas de aislamientos del CTV (Huang *et al.*, 2004; Kormaz *et al.*, 2008; Nibbet *et al.*, 2000). Hay otros sistemas basados en RT-PCR para la detección de aislamientos de CTV (Hung *et al.*, 2000; Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009); sin embargo, el uso de PCR en tiempo real reportado para el análisis de severidad de aislamientos de CTV (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2009) es relativamente costoso e implica varias regiones en el genoma del CTV diferentes al gen p25 de la proteína de cápside del virus. Asimismo, el uso de RT-PCR en una sola reacción reportado por Hung *et al.* (2000) no discrimina entre aislamientos débiles y severos.

Las pruebas realizadas con sondas (ADN) específicas marcadas con biotina se muestran en el Cuadro 3. Todos los aislamientos de CTV dieron positivo con la Sonda 0 universal para todos los aislamientos del CTV. Asimismo, el ADNc de los aislamientos T36, B53, B185, T3, B249 y T30, usado como referencia reaccionó positivamente con sus sondas específicas correspondientes (Cuadro 3). Los aislamientos CTV del MX02 a MX07 y MX10 reaccionaron con la Sonda II. Los aislamientos MX08, MX11 y MX12 reaccionaron con la Sonda VIII y el aislamiento MX13 reaccionó con las Sondas VI y VIII. El aislamiento MX14 reaccionó con la Sonda V. La Sonda VII específica para aislamientos CTV de países asiáticos no se incluyó en este estudio.

De acuerdo con estos resultados, la reacción de las muestras desde la MX02 hasta la MX07 y la MX10 de Nuevo León con la Sonda II identificó la presencia de aislamientos de CTV del tipo decaimiento en las muestras analizadas. La reacción de la muestra MX14 con la sonda V identificó la presencia de un aislamiento del tipo picado de tallo en la muestra CTV originalmente recolectada en Tamaulipas.

Las sondas específicas de grupo marcadas con biotina ADN se nombraron sobre la base de diferencias

of a number of CTV isolates with a range of different biological properties and from diverse geographical origins (Cevik, 1997; USP, 2000). These have been used for strain discrimination purposes of CTV isolates by several research groups (Genç, 2004; Halbert *et al.*, 2004; Herron *et al.*, 2005). There has been another reported hybridization based system with cDNA specific probes for strain discrimination of CTV isolates (Narváez *et al.*, 2000); however, this system was not available for comparison in this study.

The information generated from this study showed the usefulness of the MCA13 monoclonal antibody, the BD-PCR, and the biotin-labeled strain group specific cDNA probes to discriminate CTV isolates from México. These three methods were efficient to detect the presence of severe CTV isolates in Nuevo León (Table 2, 3 and Figure 1).

Nevertheless, the three methods were not 100 % coincident in results for all the CTV isolates tested, particularly between the MCA13 monoclonal antibody and the other two molecular methods tested. The BD-PCR yielded cDNA fragments of 300 and 400 bp for both MX08 and MX14 isolates (Figure 1, Table 2). This indicates a possible mix-infection in the original MX08 and MX14 samples with mild (MCA13-) and decline (MCA13+) CTV isolates being present. The detection of the 300 bp fragment in BD-PCR of the MX08 sample indicates that a severe isolate of CTV is also present. But, the lack of reactivity with the MCA13 can be attributed to a probable lower titer of this severe isolate, not detected by the serological assay. The higher sensitivity of BD-PCR, as compared to serological assay has been reported for the detection of CTV field isolates (Huang *et al.*, 2004). This feature of potential failure to detect the presence of low titer severe decline inducing CTV isolates is a disadvantage of the MCA13 monoclonal antibody over the BD-PCR. The amplification of the 400 bp product indicates that a mild isolate of CTV is also present in the same MX08 sample. Likewise, CTV isolate MX10 performed as a MCA13- in the serological tests (Table 2), but reacted with Probe II (Table 3) which is specific for severe decline inducing CTV isolates (Cevik, 1997; Nibbet *et al.*, 2000).

Both BD-PCR and hybridization with specific DNA probes were almost a 100 % coincident with the results obtained (Tables 2, 3).

en la secuencia de nucleótidos del gen p25 proteína de la cápside, de un número de aislamientos del CTV con diferentes propiedades biológicas y de orígenes geográficos diversos (Cevik, 1997; USP, 2000). Éstas se han usado para discriminación de razas del CTV por varios grupos de investigación (Genç, 2004; Halbert *et al.*, 2004; Herron *et al.*, 2005). Se ha reportado otro sistema de hibridación con sondas específicas ADNc para discriminación de razas del CTV (Narváez *et al.*, 2000); sin embargo, este sistema no estuvo disponible para la comparación en este estudio.

La información generada en el presente estudio mostró la utilidad del anticuerpo monoclonal MCA13, la PCR-BD y las sondas ADNc específicas marcadas con biotina para discriminar aislamientos del CTV de México. Estos tres métodos fueron eficientes para detectar la presencia de aislamientos severos de CTV en Nuevo León (Cuadro 2, 3 y Figura 1).

No obstante, los tres métodos no fueron 100 % coincidentes con los resultados para todos los aislamientos de CTV evaluados, especialmente entre el anticuerpo monoclonal MCA13 y los otros dos métodos moleculares. La PCR-BD dio fragmentos de ADNc de 300 y 400 pb para ambos aislamientos MX08 y MX14 (Figura 1, Cuadro 2). Esto indica una posible infección combinada en las muestras originales MX08 y MX14, con el tipo débil (MCA13-) y el tipo decaimiento (MCA13+) de aislamientos CTV. La detección del fragmento de 300 pb en PCR-BD en la muestra MX08 indica que un aislamiento severo del CTV está también presente. Pero su falta de reactividad con el MCA13 puede atribuirse a un bajo título de este aislamiento severo, no detectado con serología. La mayor sensibilidad de la PCR-BD, en comparación con las pruebas serológicas ha sido reportada para la detección de aislamientos de CTV de campo (Huang *et al.*, 2004). Esta incapacidad para detectar la presencia de aislamientos severos en bajas concentraciones, es una desventaja del anticuerpo monoclonal MCA13 en comparación con la PCR-BD. La amplificación del producto 400 pb indica que un aislamiento del tipo débil del CTV está presente en la misma muestra MX08. Asimismo, el aislamiento de CTV MX10 se comportó como MCA13- en las pruebas serológicas (Cuadro 2), pero reaccionó con la Sonda II (Cuadro 3) que es específica para aislamientos de CTV que inciden decaimiento severo (Cevik, 1997; Nibbet *et al.*, 2000).

The lack of a 100 % coincidence mostly with the use of the MCA13 antibody over the molecular methods has been reported, and it can be attributed to the higher sensibility of the molecular methods (Huang *et al.*, 2004) and to the presence of mixed isolates of CTV in the original field sample after the passage through several citrus hosts (Nickel *et al.*, 1996).

The reactivity of the MCA13 monoclonal antibody, along with the amplification of 300 bp cDNA fragments in the BD-PCR test (Figure 1, Table 2), and hybridization with Probe II with samples MX02 through MX08, MX11, MX13, and with Probe V by MX14 (Table 3) provide evidence of the presence of severe CTV isolates in the samples collected from Nuevo León and Tamaulipas. The detection of severe CTV isolates by molecular methods has also been documented for the states of Veracruz and Puebla by BD-PCR (Almeyda-León *et al.*, 2007).

The finding of severe CTV isolates in the samples analyzed in this study, is of interest even in the absence of decline symptoms in field trees. The CTV has been a regulated pathogen in México since 1997 and up to 2006, and 4468 symptomless CTV infected plants were detected in the 20 citrus producing states (SAGARPA, 2006). Although the original field CTV infected plants in Nuevo León (Silva-Vara *et al.*, 2001) and elsewhere in México (SAGARPA, 2006) have been removed from the field, the occurrence of symptomless severe CTV isolates should not be ignored. These findings reinforce the need for continuing the CTV campaign nationwide. It has been documented that latent severe CTV isolates infections can be present in a citrus industry for many years, and even decades without any noticeable evidence of disease symptoms, until the unexpected decline due to CTV occurs when efficient aphid vectors either increase their populations or become established in new locations (Bar-Joseph, 1978; Rocha-Peña *et al.*, 1995a, 1998). The brown citrus aphid (*Toxoptera citricida*) and the melon aphid (*Aphis gossypii*) are the most important aphid vectors of CTV (Rocha-Peña *et al.*, 1995a; Yokomi *et al.*, 1994), and both species are present in México (Rocha-Peña *et al.*, 2005; SAGARPA, 2006; Silva-Vara *et al.*, 2001). The *T. citricida* transmits CTV isolates 6 to 25 times more efficiently than *A. gossypii* (Yokomi

Tanto la PCR-BD y la hibridación con sondas específicas fueron casi 100 % coincidentes con los resultados obtenidos (Cuadros 2, 3).

La falta de un 100 % de coincidencia, principalmente entre el anticuerpo MCA13 y los métodos moleculares se ha reportado, y se puede atribuir a una mayor sensibilidad de los métodos moleculares (Huang *et al.*, 2004), así como a la presencia de la mezclas de aislamientos de CTV en la muestra original de campo, después del paso por varios hospederos de cítricos (Nickel *et al.*, 1996).

La reactividad del anticuerpo monoclonal MCA13, junto con la amplificación de fragmentos de ADNc de 300 pb en la PCR-BD (Figura 1, Cuadro 2) y la hibridación con la Sonda II de las muestras MX02, a las MX08, MX11, MX13 y con la Sonda V por la muestra MX14 (Cuadro 3) da evidencia de la presencia de aislamientos severos del CTV en las muestras recolectadas en Nuevo León y Tamaulipas. La detección de aislamientos severos de CTV mediante los métodos moleculares también se ha documentado para los estados de Veracruz y Puebla mediante PCR-BD (Almeyda-León *et al.*, 2007).

El haber encontrado aislamientos severos de CTV en las muestras analizadas en el presente estudio, es de interés, no obstante la ausencia de síntomas de decaimiento en árboles de campo. El CTV fue un patógeno bajo cuarentena en México de 1997 a 2006, y se detectaron 4468 plantas asintomáticas infectadas por el CTV en los 20 estados productores de cítricos (SAGARPA, 2006). Aunque las plantas originales detectadas como infectadas por el CTV en Nuevo León (Silva-Vara *et al.*, 2001) y en otras partes de México (SAGARPA, 2006) han sido eliminadas del campo, la ocurrencia de aislamientos del CTV severos asintomáticos no debería ignorarse. Estos resultados refuerzan la necesidad de continuar la campaña de CTV en todo el país. Se ha documentado que las infecciones latentes de aislamientos severos del CTV pueden estar presentes en una industria citrícola por muchos años e incluso por décadas, aun en ausencia de síntomas de la enfermedad, hasta que inesperadamente se presentan síntomas de decaimiento debido al aumento en poblaciones o invasión en nuevas áreas de áfidos vectores eficientes (Bar-Joseph, 1978; Rocha-Peña *et al.*, 1995a, 1998). El pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) y el áfido del melón (*Aphis gossypii*) son los áfidos vectores más importantes del CTV (Rocha-Peña *et al.*, 1995a; Yokomi *et al.*, 1994)

et al., 1994). Wherever the *T. citricida* has been introduced, severe decline strains of CTV have appeared, and in some instances, stem-pitting strains of CTV (Halbert *et al.*, 2004; Rocha-Peña *et al.*, 1995a, 1998).

CONCLUSIONS

It can be concluded the usefulness of the serological and molecular tools for the discrimination of CTV isolates. Both BD-PCR and hybridization with specific DNA probes were more suitable for strain discrimination of CTV isolates, than the MCA13 monoclonal antibody. The BD-PCR was able to detect mixtures of mild and severe CTV isolates, while hybridization with specific DNA probes was suitable for detecting either mild, decline inducing and stem pitting CTV isolates. In the state of Nuevo León severe CTV isolates were discovered.

ACKNOWLEDGMENTS

This research had support by Fundación Produce Nuevo León, A. C. grant No. 1322, CONACYT-SIREYES Project No. 032/95, both Institutions from México, and by the USDA/University of Florida Specific Cooperative Research Agreement and the Binational Agricultural Research and Development with Israel (BARD). Journal Series Number INIFAP/CIRNE/A-447.

LITERATURE CITED

- Almeyda-León, I. H., M. A. Rocha-Peña, M. M. Iracheta-Cárdenas, F. Orona-Castro, y R. X. Loreda-Salazar. 2007. Técnicas moleculares para detectar enfermedades vasculares en cítricos. Primera Semana Internacional de la Citricultura. INIFAP, Campo Experimental Ixtacuaco. Martínez de la Torre, Veracruz, México. 117 p.
- Bar-Joseph, M. 1978. Cross-protection incompleteness: A possible cause for natural spread of *citrus tristeza virus* after a prolonged lag period in Israel. *Phytopathology* 68: 1110-1111.
- Brlansky, R. H., V. D. Damsteegt, 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, H. R. Pappu, D. Benscher, M. Irey, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1996. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: detection and strain differentiation. In: J. V. da Graça, P. Moreno, and L. W. Timmer (eds). *Proc. 13th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 17-24.
- Garnsey, S. M., E. L. Civerolo, D. J. Gumpf, C. Paul, M. E. Hilf, R. F. Lee, R. H. Brlansky, R. K. Yokomi, and y ambas especies están presentes en México (Rocha-Peña *et al.*, 2005; SAGARPA, 2006; Silva-Vara *et al.*, 2001). El *T. citricida* transmite aislamientos de CTV de 6 a 25 veces más eficientemente que *A. gossypii* (Yokomi *et al.*, 1994). En cualquier lugar en que *T. citricida* se ha introducido, han aparecido razas del tipo decaimiento y en algunos casos, razas de CTV del tipo picado de tallo (Halbert *et al.*, 2004; Rocha-Peña *et al.*, 1995a, 1998).
- Se puede concluir la utilidad de las herramientas serológicas y moleculares para la discriminación de aislamientos de CTV. Tanto la PCR-BD y la hibridación con sondas de ADN específicas fueron más adecuadas para la discriminación de razas del CTV que el anticuerpo monoclonal MCA13. La PCR-BD pudo detectar mezclas de aislamientos de CTV severos y débiles, mientras que la hibridación con sondas de ADN específicas fue adecuada para detectar los tipos débil, decaimiento y picado de tallo. En el estado de Nuevo León se descubrieron aislamientos severos de CTV.
- Fin de la versión en español—
- *—
- J. S. Hartung. 2005. Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In: M. E. Hilf, N. Durán-Vila, and M. A. Rocha-Peña (eds). *Proc. 16th Conf. Intern. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 75-93.
- Genç, H. 2005. A new method for the detection of minor populations of citrus tristeza virus strains infecting single citrus trees. *Turk. J. Agric. For.* 29: 449-459.
- Halbert, S. E., H. Genç, B. Cevik, L. G. Brown, I. M. Rosales, K. L. Manjunath, M. Pomerinke, D. A. Davison, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 2004. Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in south Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Dis.* 88: 935-941.
- Herron, C. M., T. E. Mirkov, N. Solís-Gracia, C. J. Kahlke, M. Skaria, and J. V. da Graça. 2005. Severity of *Citrus tristeza virus* isolates from Texas. *Plant Dis.* 89: 575-580.
- Huang, Z., P. Rundell, X. Guan, and C. A. Powell. 2004. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88: 625-629.
- Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *J. Phytopathol.* 148: 469-475.

- Iracheta-Cárdenas, M., B. D. Sandoval-Alejos, M. E. Román-Calderón, K. L. Manjunath, R. F. Lee, and M. A. Rocha-Peña. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of *Citrus tristeza virus* and their effectiveness for virus detection. *J. Phytopathol.* 156: 243-250.
- Korkmaz, S., B. Çevik, S. Önder, and N. K. Koç. 2008. Biological, serological, and molecular characterization of *Citrus tristeza virus* isolates from different citrus cultivation regions of Turkey. *Turkish J. Agric. For.* 32: 369-379.
- Marques, N. T., A. M. Bailey, C. L. Niblett, and G. Nolasco. 2006. Differentiation of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates by cleavage fragment length polymorphism (CFLP) analysis of the major coat protein gene. *Phytopathologia Mediterranea* 45: 99-109.
- Narváez, G., B. S. Skander, M. A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, and P. Moreno. 2000. A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridisation with digoxigenin-labelled cDNA probes. *J. Virol. Methods* 85: 83-92.
- Niblett, C. L., H. Genc, B. Cevik, S. Halbert, L. Brown, G. Nolasco, G. Bonacalza, K. L. Manjunath, V. J. Febres, H. R. Pappu, and R. F. Lee. 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of the citrus tristeza disease. *Virus Research* 71: 91-106.
- Nickel, O., H. P. Santos Filho, and A. D. Vilarinhos. 1996. Segregation of citrus tristeza virus strains by graft propagation. *In: J. V. Graça, P. Moreno, and R. K. Yokomi* (eds). *Proc. 13th Conf. Int. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 64-70.
- Nikolaeva, O. V., A. V. Karasev, S. M. Garnsey, and R. F. Lee. 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Dis.* 82: 1276-1280.
- Pappu, H. R., S. S. Pappu, C. L. Niblett, R. F. Lee, R. F., and E. L. Civerolo. 1993. Comparative sequence analysis of the coat protein gene of biologically distinct citrus tristeza virus isolates. *Virus Genes* 7: 255-264.
- Permar, T. A., S. M. Garnsey, D. J. Gumpf, and R. F. Lee. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- Rocha-Peña M. A., F. M. Ochoa-Corona, J. P. Martínez-Soriano, C. N. Roistacher, and R. F. Lee. 1998. Citrus tristeza virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Sci.* 50: 26-36.
- Rocha-Peña, M. A., J. I. López-Arroyo, M. A. Peña del Río, and I. H. Almeyda-León. 2005. Current situation on citrus virus and virus-like diseases and their vectors in Mexico. *In: N. Durán-Vila, M. E. Hilf, M. A. Rocha-Peña* (eds). *Proc 16th Conf Intern Organ Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 381-385.
- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1991. Development of a dot-immunobinding assay for citrus tristeza virus. *J. Virol. Methods* 34: 297-309.
- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, F. M. Ochoa-Corona, S. M. Garnsey, and R. K. Yokomi. 1995a. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Dis.* 79: 437-445.
- Rocha-Peña, M. A., R. F. Lee, and R. K. Yokomi. 1995b. Biological properties and aphid transmission of selected citrus tristeza virus isolates from Florida. *Rev. Mex. Fitopatol.* 13: 88-94.
- Roy, A., P. Ramachandran, and R.H. Bransky. 2003. Grouping and comparison of Indian citrus tristeza virus isolates based on coat protein gene sequences and restriction analysis patterns. *Arch. Virol.* 148: 707-722.
- SAGARPA. 2006. Avances del Programa Nacional de Reconversión Productiva de la Cadena Citrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México. 24 p.
- Silva-Vara, S., M. A. Peña del Río, R. Peña-Martínez, N. Villegas-Jiménez, K. F. Byerly-Murphy, y M. A. Rocha-Peña. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35: 441-450.
- USP. 2000. Detection and differentiation of specific strains of *Citrus tristeza virus*. United States Patent Number 6,140,046. <http://www.freepatentsonline.com/6140046.html> (Accessed January, 2008).
- Yokomi, R. K., R. Lastra, M. B. Stoetzel, V. D. Damgsteet, R. F. Lee, S. M. Garnsey, T. R. Gottwald, M. A. Rocha-Peña, and C. L. Niblett. 1994. Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and its transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 1078-1085.