



Tesis de Maestría PEDECIBA BIOLOGÍA  
Sub-área BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILODINÁMICA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

Lic. María José Benítez Galeano

Orientador: Dr. Rodney Colina Muñoz

Co-Orientador: Dr. Matías Victoria Montero

Laboratorio de Virología Molecular  
CENUR Noroeste  
Salto, Uruguay  
2014



## AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por otorgarme la beca de posgrado que me permitió realizar este trabajo con dedicación exclusiva.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por aceptarme en el mismo.

A los miembros del tribunal, Sabina Vidal, Juan Cristina y Héctor Romero, por aceptar la corrección de esta tesis y corregirla en tan poco tiempo.

A Fernando Rivas, director del Programa Nacional de Investigación Citrícola, de INIA Salto Grande. A Ana Bertalmío, Leticia Rubio y Diego Maeso de INIA Salto Grande y Las Brujas. A todos ellos agradezco el continuo asesoramiento agronómico y la constante disponibilidad para el intercambio de ideas. Y gracias por enseñarme de citricultura! No me olvido de Roque, gracias por coleccionar las muestras.

A Rodney, mi tutor, el jefe, siempre a mil pero siempre disponible. Gracias por permitirme ser parte del LVMS. Gracias por hacernos saber que contamos contigo, por estar en las buenas y en las malas, por saber comprender y por poner las cosas en el lugar en el momento justo!

A mis colegas, compañeros, amigos del LVMS... Andrés, Matías, Luciana, Fernando, Leticia y Matías... por bancarme todos los días, por compartir largas jornadas juntos y hacerlas geniales. Por acompañarme cuando el estar lejos de casa se hizo difícil, al igual que para todos. Y por supuesto, por ayudar entre todos a salir de los atascos experimentales. Creo que formamos un gran equipo!

A Matías, además de colega y amigo, compañero de casa... Que decir Mati, gracias por estar siempre, en las buenas y malas, desde hace ya tres años que nos embarcamos en esto de vivir en Salto. Y sobre todas las cosas, gracias por enseñarme que todas las cosas en la vida SIEMPRE tienen un lado positivo.

A la ONU Salteña, mis amigos no circunstanciales. Salú!

A mis amigas de la vida, solo lejos físicamente. Gracias por hacerme ser como soy, gracias por ser parte de mi vida, algunas de hace mucho, otras no tanto, pero todas forman un pedacito de mi. Las quiero!

A la ciencia, carrera que me encanta y me hace feliz, esto es lo que me gusta!

A mi hermosa y gran familia, gracias por siempre darme para adelante, por las ricas charlas-debate y por siempre ser tan unidos. Por más y más cantarolas, lotería, idas a Colón y demás!

Por último, pero no por eso menos importante, el mayor agradecimiento del mundo y de la vida, a mis padres, Mario y Patricia, y a mi hermano Juan Pablo, por estar siempre a mi lado, acompañándome en este largo y loco camino que elegí. Los amo!

*A María Pía, Aparicio  
y a quien viene en camino.*

# INDICE

<b>ABREVIACIONES</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	11
1.1. Citricultura .....	11
1.1.1 La Citricultura en Uruguay.....	13
1.2. Enfermedades en Cítricos y sus Agentes Causales .....	14
1.2.1. La Tristeza de los Cítricos.....	16
1.3. El Vector del Virus de la Tristeza de los Cítricos .....	17
1.4. Virus de la Tristeza de los Cítricos .....	21
1.4.1. Clasificación Taxonómica.....	22
1.4.2. Historia de CTV .....	22
1.4.3. Estructura de CTV.....	24
1.4.4. Organización genómica.....	24
1.4.5. Proteínas Virales .....	27
1.4.6. Ciclo de Replicación Viral.....	31
1.4.7. Métodos de Control de la Enfermedad .....	32
1.4.8. Evolución de CTV.....	34
1.4.9. Métodos de Diagnóstico .....	38
1.4.10. Descripción de la problemática .....	42
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	45
2.1. Objetivo General .....	45
2.2. Objetivos Específicos.....	45
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	46
3.1. Muestras .....	46
3.2. Extracción de ARN .....	47
3.3. Obtención del ADN copia .....	48
3.4. PCR en Tiempo Real.....	49
3.5. PCR en Tiempo Final .....	50
3.6. Electroforesis .....	52
3.7. Purificación de productos de PCR.....	53
3.8. Clonación de fragmentos génicos .....	53
3.9. Extracción del DNA plasmídico .....	55
3.10. Secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR en tiempo final y por clonación .....	57
3.11. Edición y alineamiento de secuencias.....	57
3.12. Análisis filogenéticos .....	57
3.13. Estudios de recombinación .....	59
3.14. Análisis de coalescencia.....	59
<b>4. RESULTADOS</b> .....	60
4.1. Comparación de metodologías de extracción de ARN.....	60
4.2. Detección de CTV por PCR en tiempo real .....	60

4.3. Detección de CTV por PCR en tiempo final.....	61
4.4. Composición de las poblaciones virales .....	63
4.5. Análisis de genomas completos.....	64
4.6. Caracterización de aislados de CTV mediante el análisis de secuencias mayoritarias .....	65
4.7. Composición poblacional de los aislados uruguayos .....	67
4.8. Análisis filogenético de CTV a nivel regional .....	74
4.9. Estudio de secuencias recombinantes.....	78
4.10. Análisis de coalescencia .....	81
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b>6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>93</b>
<b>8. ANEXO .....</b>	<b>106</b>

## ABREVIACIONES

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARG: Argentina

ARN: Ácido Ribonucleico

BRA: Brasil

c.s.p.: cantidad suficiente para

cDNA: ADN copia

CTV: *Citrus Tristeza Virus*; Virus de la Tristeza de los Cítricos

dNTP: Desoxinucleótido Trifostato

DMSO: Dimetil Sulfóxido

*E. coli* NEB5- $\alpha$ : *Escherichia coli* cepa NEB5- $\alpha$

ELISA: *Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*; Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

FAM: 6-carboxifluoresceína

°C: grados Celcius

g: gramos

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

LB: Luria-Bertani

LC: *Leaf cupping*; Hoja cuchara

$\mu$ g: microgramo

MGAP: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca

$\mu$ l: microlitro

min: minutos

ml: mililitro

mM: milimolar

M: Molar

ng: nanogramo

NR: No Realizado

nt: nucleótido

pb: pares de bases

PM: Peso Molecular

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en cadena de la polimerasa

pmol: picomoles

RT: Retrotranscripción / Retrotranscriptasa

seg: segundos

SP: *Stem pitting*; Acanaladuras en la madera

TA: Temperatura ambiente

TAE: Tris base-Acetato-EDTA

TAMRA: tetrametilrodamina

UV: Ultravioleta

UY: Uruguay

VC: *Vein clearing*; Aclaramiento de nervaduras

VCK: *Vein Corcking*; Acorchamiento de nervaduras

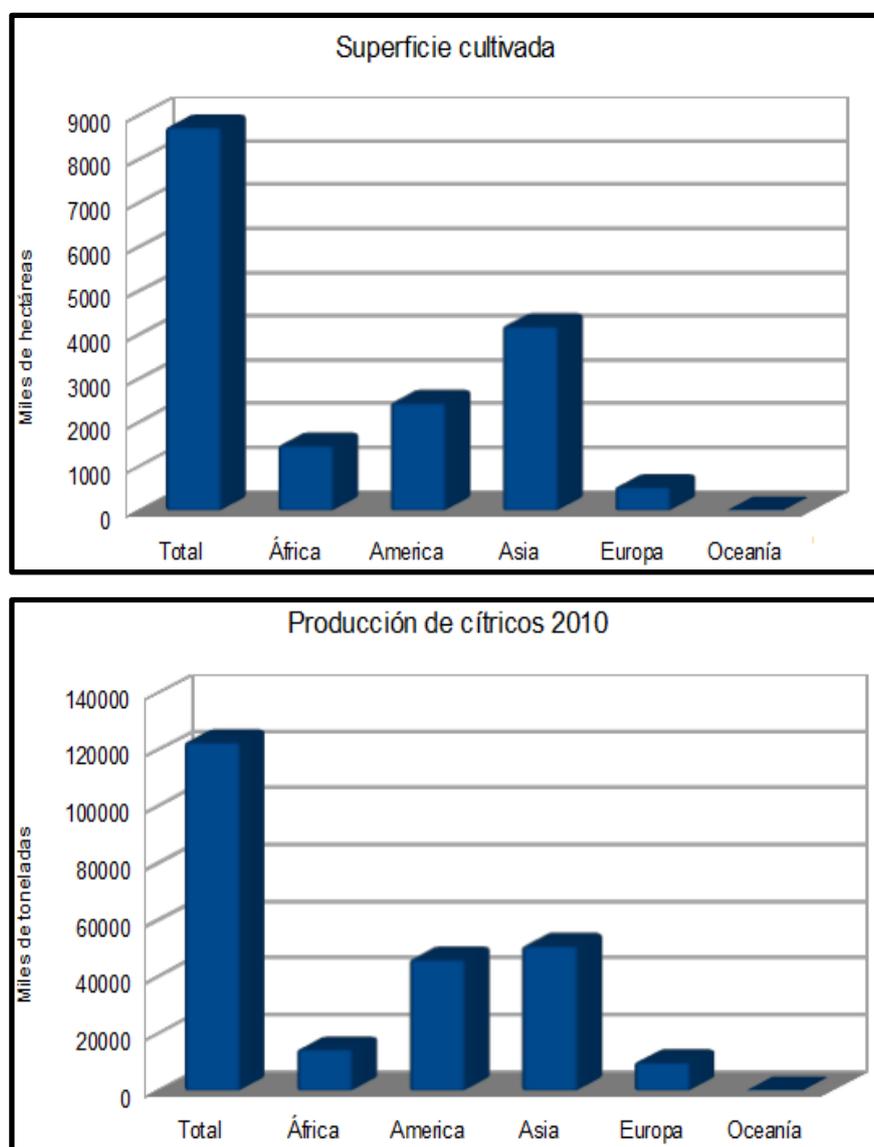
## RESUMEN

Desde que apareció hace dos siglos atrás, la enfermedad conocida como Tristeza, es la enfermedad viral más devastadora de la industria citrícola a nivel mundial. Su agente etiológico, el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), es transmitido por injertos de material vegetal infectado o por insectos vectores como el áfido *Toxoptera citricida*. La existencia de variantes genéticas del virus con diversos grado de severidad, han sido reportadas en todas las áreas citrícolas afectadas. La caracterización de aislados de CTV puede proveer información epidemiológica importante que puede ser de gran utilidad para el control de la enfermedad. En el Uruguay, no existen datos moleculares, que reflejen las variantes genéticas circulantes en el país. En el presente estudio se logró poner a punto un método de diagnóstico rápido y altamente sensible, basado en RT-PCR en tiempo real con tecnología TaqMan. A su vez, se logró establecer las relaciones filogenéticas de las cepas circulantes en el país en el presente y 15 años atrás, mediante la amplificación de los genes p25, p20 y p23 utilizando la técnica de RT-PCR. Por último, se logró conocer la composición de variantes genéticas en los distintos aislados utilizando como metodología la clonación. Los resultados mostraron que CTV presenta una gran diversidad genética, observando la co-circulación de cuatro genotipos en la región, incluyendo la presencia de un genotipo esencialmente Sudamericano formado por cepas exclusivamente de Uruguay y Argentina. El genotipo más prevalente fue el genotipo VT, como ha sido reportado para el resto del mundo. Como se ha descrito en la literatura, los aislados que circulan en el país lo hacen en forma de poblaciones, pudiendo observar aislados conformados por más de un genotipo, incluyendo la presencia de aislados recombinantes. Esto confirma la gran variabilidad genética que presenta CTV. Por último, se logró explicar las fluctuaciones en el tiempo que sufrió el clado Sudamericano, desde su origen al presente, así como estimar el ancestro común más reciente y su tasa de evolución. Consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo serán de gran utilidad para los productores y entidades de vigilancia sanitaria, con el objetivo de incorporarlos a los subsiguientes planes de manejo y control. Cabe resaltar que este trabajo consiste en el primer registro en Uruguay de diagnóstico y caracterización de CTV mediante el uso de técnicas moleculares.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Citricultura

Los cítricos son el cultivo frutal más importante a nivel económico en el mundo. Este cultivo, que se originó en el sureste asiático, en la actualidad se extiende por la mayor parte de las zonas tropicales y subtropicales del planeta, abarcando los cinco continentes. Datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), indican que actualmente se dedican más de 8.7 millones de hectáreas (ha) al cultivo de los cítricos en el mundo, con una producción aproximada de 123 millones de toneladas al año (Figura 1.1) (Libro Anual Estadístico 2013, FAO, [www.fao.org](http://www.fao.org)).



**Figura 1.1.** Representación gráfica donde se muestran datos de superficie de tierra cultivada con cítricos y su respectiva producción, distribuida en los distintos continentes así como el total en el mundo, para el año 2010. Datos tomados de la FAO. [www.fao.org](http://www.fao.org)

El término “cítricos” se utiliza para designar un conjunto de especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* de la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioidea* (Ruiz, 2009).

Las especies cítricas cultivadas se pueden englobar en cuatro grandes grupos: las naranjas, que incluye las dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y las amargas (*C. aurantium* L.); las mandarinas, incluyendo las satsumas (*C. unshiu* (Mak.) Marc.) y las clementinas (*C. clementina* Hort. ex Tan.); los limones (*C. limón* (L.) Burm. f.) y limas (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.); y finalmente los pomelos (*C. paradisi* Macf.) (Ruiz, 2009).

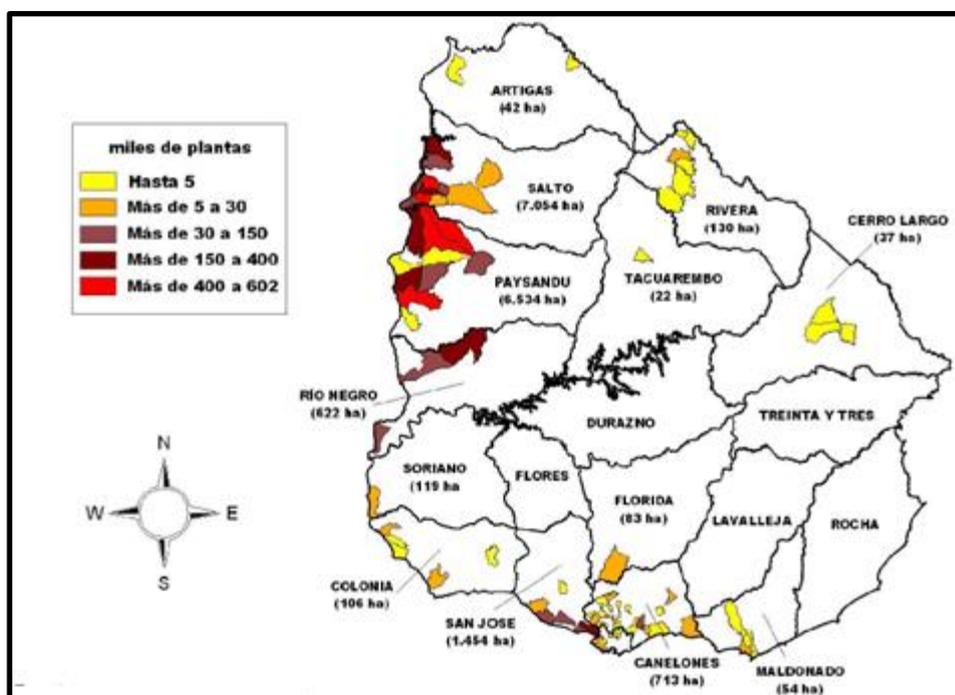
En la mayor parte del mundo, el cultivo de los cítricos se realiza injertando yemas de una variedad seleccionada sobre un pie o patrón cultivado a partir de semilla. Las especies o híbridos utilizados como pie son poliembriónicas y al sembrar sus semillas generalmente germina uno de los embriones nucelares en lugar del embrión cigótico, lo que da lugar a la homogeneidad genética de los patrones en una plantación. Por otro lado, la propagación vegetativa de la variedad injertada sobre el pie garantiza la uniformidad genética de las copas. Este proceso permite elegir el pie más adecuado para las condiciones locales de cultivo y la variedad que se desea producir, asegurando la homogeneidad de la producción. Sin embargo, la reducida variedad genética del cultivo hace que las plantaciones sean más vulnerables al ataque por patógenos (Ruiz, 2009).

A lo largo de la historia, la utilización de distintos pies ha estado condicionada en buena medida por la aparición y dispersión de distintos patógenos. Las epidemias ocurridas en el siglo XIX por oomicetes del género *Phytophthora* dieron lugar a la utilización casi exclusiva del naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) como patrón, dada su resistencia a la enfermedad producida por este patógeno y a sus buenas cualidades agronómicas. Sin embargo, con la aparición de la enfermedad conocida como Tristeza, causada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (*Citrus Tristeza Virus*, CTV), ocurrió la destrucción masiva de estas plantaciones. Es así que en la actualidad la especie *Poncirus trifoliata* y los híbridos citrange Carrizo y Troyer, son los patrones más utilizados por su tolerancia al decaimiento causado por CTV y por la buena calidad de fruta que inducen en las variedades Moreno *et al.*, 2008; Roistacher *et al.*, 2010).

### 1.1.1 La Citricultura en Uruguay

En Uruguay, la citricultura es un rubro con un fuerte impacto socio-económico y constituye un sector exportador en expansión, el de mayor importancia dentro de lo hortifruticultura (Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola, 1996). En el año 2011, la producción de cítricos alcanzó un total de 270,4 mil toneladas, equivalentes a 120,2 millones de dólares (Anuario Estadístico Agropecuario, DIEA, MGAP, 2011).

Las regiones cítricas abarcan 17.018 ha cultivadas con un total de 7.531.000 plantas, de las cuales 5.895.000 son productivas y ocupan 13.542 ha. Se pueden diferenciar claramente dos regiones cítricas en nuestro país, al norte y al sur del Río Negro (Figura 1.2). La zona norte comprende los departamentos de Salto, Paysandú, Río Negro y Rivera, y es la región cítrica por excelencia, abarcando un 83% (14.200 ha) de la superficie total cultivada, concentrando el 90% de la producción de naranjas, mandarinas y pomelos. Por otro lado, la zona sur que comprende los departamentos de Colonia, San José, Montevideo y Maldonado, abarca el 17% (2.800 ha) del total de la superficie cultivada y genera el 70% de la producción de limón.



**Figura 1.2.** Distribución de las regiones cítricas del Uruguay donde se indica la cantidad de plantas ubicadas en cada departamento en el año 2011. Tomado de MGAP, 2011.

Desde el punto de vista comercial, las naranjas constituyen el 50% de la producción cítrica nacional y representan el 55% de las exportaciones, seguidas por mandarinas y limones con un 35% y 10% respectivamente, produciendo un ingreso al país de aproximadamente 80 millones de dólares en el 2011 (Anuario Estadístico Agropecuario, DIEA, MGAP, 2011).

Al inicio de la citricultura del país, se usó como portainjerto al naranjo dulce, pero fue devastado por la podredumbre del pie causada por *Phytophthora* sp. Luego, las plantaciones comerciales en Uruguay, hasta la década de los 40, se encontraban injertadas sobre un patrón de naranjo amargo, variedad cítrica tolerante a viroides y otras enfermedades. Sin embargo, la aparición de razas severas de CTV generó una pandemia mundial afectando las variedades cítricas injertadas sobre este portainjerto, provocando la muerte de millones de plantas y obligando a la sustitución del naranjo amargo por portainjertos alternativos que se comportaran de manera tolerante a CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1989). De esta manera, aproximadamente el 90% de las plantas cítricas nacionales se establecieron, y se mantienen hasta el la fecha, sobre el patrón *P. trifoliata* L. Raf. y sus híbridos Citrange Carrizo y Troyer, los cuales son tolerantes a CTV aunque altamente susceptibles a las infecciones por viroides.

## **1.2. Enfermedades en Cítricos y sus Agentes Causales**

Las distintas especies de cítricos son susceptibles a numerosas enfermedades causadas por diversos microorganismos cuya consecuencia directa es la disminución en la producción, lo que provoca enormes pérdidas económicas en todas las zonas afectadas del mundo (Moreno *et al.*, 2008).

Las enfermedades de mayor importancia son aquellas cuya vía o ruta de transmisión es el injerto, siendo los agentes responsables parásitos intracelulares tales como bacterias, virus y viroides que se propagan junto con el material vegetal. Algunas de estas enfermedades transmisibles por injerto se logran controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal a propagar (Navarro, 1993). Sin embargo, no todas presentan esta única vía de propagación. La transmisión mecánica con herramientas de corte (poco frecuente) o a través de insectos vectores del patógeno (muy frecuente), son también mecanismos de gran impacto en cuanto a la dispersión de los

agentes, lo que dificulta enormemente su control. Existen diversas enfermedades causadas por virus, viroides y bacterias que afectan este tipo de cultivos (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Enfermedades transmisibles por injerto más importantes en los cítricos agrupadas por tipo de patógeno. Tomada de Durán-Vila & Moreno, 2000.

Enfermedad	Agente causal	Género	Transmisión por vectores
<b>Viroides</b>			
Cachexia	<i>Hop Stunt Viroid</i> (HSVd)	<i>Hostuviroid</i>	No
Exocortis	<i>Citrus Exocortis Viroid</i> (CEVd)	<i>Pospiviroid</i>	No
Bolsas de goma	Probablemente un viroide	?	No
Corteza gomosa	Probablemente un viroide	?	No
<b>Virus</b>			
Enanismo del mandarino Satsuma	<i>Satsuma Dwarf Virus</i> (SDV)	<i>Sadwavirus</i>	?
Manchado foliar de los cítricos	<i>Citrus Leaf Blotch Virus</i> (CLBV)	<i>Citrivirus?</i>	?
Hoja rasgada	<i>Citrus Tatter Leaf Virus</i> (CTLV)	<i>Capilovirus</i>	No
Hoja rugosa	<i>Citrus Leaf Rugose Virus</i> (CiLRV)	<i>Iilarvirus</i>	No
Leprosis	<i>Citrus Leprosis Virus</i> (CiLV)	<i>Cilerivirus</i>	Si
Mosaico amarillo	<i>Citrus Yellow Mosaic Virus</i> (CMBV)	<i>Badnavirus</i>	?
Protuberancias nerviales/ agallas en la madera	Probablemente un luteovirus	?	Si
Psorosis	<i>Citrus Psorosis Virus</i> (CPsV)	<i>Ophiovirus</i>	?
Tristeza	<i>Citrus Tristeza Virus</i> (CTV)	<i>Closterovirus</i>	Si
Muerte súbita	Etiología desconocida/ <i>Citrus Sudden Death-associated virus</i> + CTV?	?	Si
Variegación infecciosa	<i>Citrus Variegation Virus</i> (CVV)	<i>Iilarvirus</i>	No
Concavidades gomosas	Etiología desconocida/ posiblemente virus		No
Cristacortis	posiblemente virus		No
Enanismo clorótico	posiblemente virus		Si
Impietratura	posiblemente virus		No
Incompatibilidad sobre limón rugoso	posiblemente virus		?
Manchas anulares amarillas	posiblemente virus		No
<b>Bacterias</b>			
Clorosis variegada	<i>Xylella fastidiosa</i>	<i>Xylella</i>	Si
Huanglongbing	<i>Candidatus Liberibacter asiaticum</i> , <i>africanum</i> o <i>americanum</i>	<i>Candidatus Liberibacter</i>	Si
Stubbom	<i>Spiroplasma citri</i>	<i>Spiroplasma</i>	Si
Escobas de bruja de la lima	<i>Candidatus Phytoplasma aurantifolia</i>	<i>Candidatus Phytoplasma</i>	?
Blight	Etiología desconocida		?

Los virus que provocan las enfermedades conocidas como Tristeza y Psorosis, junto con el viroide que produce la Exocortis, son los agentes transmisibles por injerto de mayor incidencia en los cultivos cítricos de nuestro país, causando pérdidas económicas estimadas en el orden del 30% de la producción cítrica nacional. La infección producida por estos agentes se caracteriza por disminuir el vigor de los árboles afectados así como su vida útil, conduciéndolos a producir fruta de menor calibre, calidad y en cantidades menores, e incluso pueden provocar la muerte de los árboles (MGAP, 1981; Bertalmío *et al.*, 2012).

### **1.2.1. La Tristeza de los Cítricos**

Desde hace ya dos siglos, la Tristeza es una de las enfermedades más destructivas y más estudiada de los cítricos (Roistacher *et al.*, 2010). El tipo e intensidad de los daños provocados por la Tristeza en el campo, depende de las especies infectadas, del patrón sobre el que están injertadas, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Grant & Costa, 1951; Roistacher & Moreno, 1991). De acuerdo a lo anterior, CTV puede causar tres síndromes diferentes conocidos como Tristeza, *Stem Pitting* (SP) y *Seedling Yellows* (SY) (Moreno *et al.*, 2008).

La Tristeza es un síndrome que causa declinamiento provocado por la infección de CTV a diferentes especies de cítricos (naranja dulce, mandarina, pomelo y lima) injertados sobre naranja amarga o limón. La expresión más dramática de esta enfermedad es el declinamiento rápido, por el cual árboles de apariencia normal comienzan a mostrar síntomas de marchitamiento y colapsan completamente en pocas semanas (Figura 1.3 A). Comúnmente, los árboles afectados muestran un follaje amarillento o verde pálido, caída de hojas y muerte regresiva de ramas, pequeñas hojas cloróticas y frutas pequeñas de colores pálidos con valor comercial nulo (Figura 1.3 B). CTV induce el colapso y la muerte de los vasos conductores de savia, produciendo cantidades excesivas de floema no funcional en la unión injerto-pie (Schneider, 1959). Esto impide el pasaje de materiales elaborados en la copa hacia las raíces del árbol, lo que resulta en la muerte del sistema radicular.

El síndrome llamado “Acanaladuras en la madera” o *Stem Pitting* se inicia por la interrupción de la actividad meristemática en áreas limitadas del cambium, que resulta en un crecimiento radial irregular con depresiones locales (Schneider; 1959). La formación de canales puede limitar el crecimiento radial del tallo y produce atrofia, follaje delgado con

hojas pequeñas y amarillas, poca producción de frutos y además estos son muy pequeños y casi sin jugo, lo que impide su comercialización (Figura 1.3 C, 1.3 D y 1.3 G). Otros síntomas observados son el aclaramiento y acorchamiento de nervaduras foliares (Figura 1.3 F). Los cultivares sensibles a SP son afectados independientemente de la combinación variedad-pie. A diferencia de tristeza, el SP no causa, por lo general, la muerte del árbol, sino que lo convierte en un árbol con permanentes limitaciones de producción provocando grandes pérdidas económicas (Moreno *et al.*, 2008).

Por último, el “Amarillamiento de plantas” o *Seedling Yellows* se caracteriza por generar trastornos de crecimiento. Se observan hojas amarillas, un sistema radicular reducido y, a veces, el cese del crecimiento de árboles de naranjo amargo, pomelo o limón (Fraser, 1952; McClean, 1963) (Figura 1.3E).

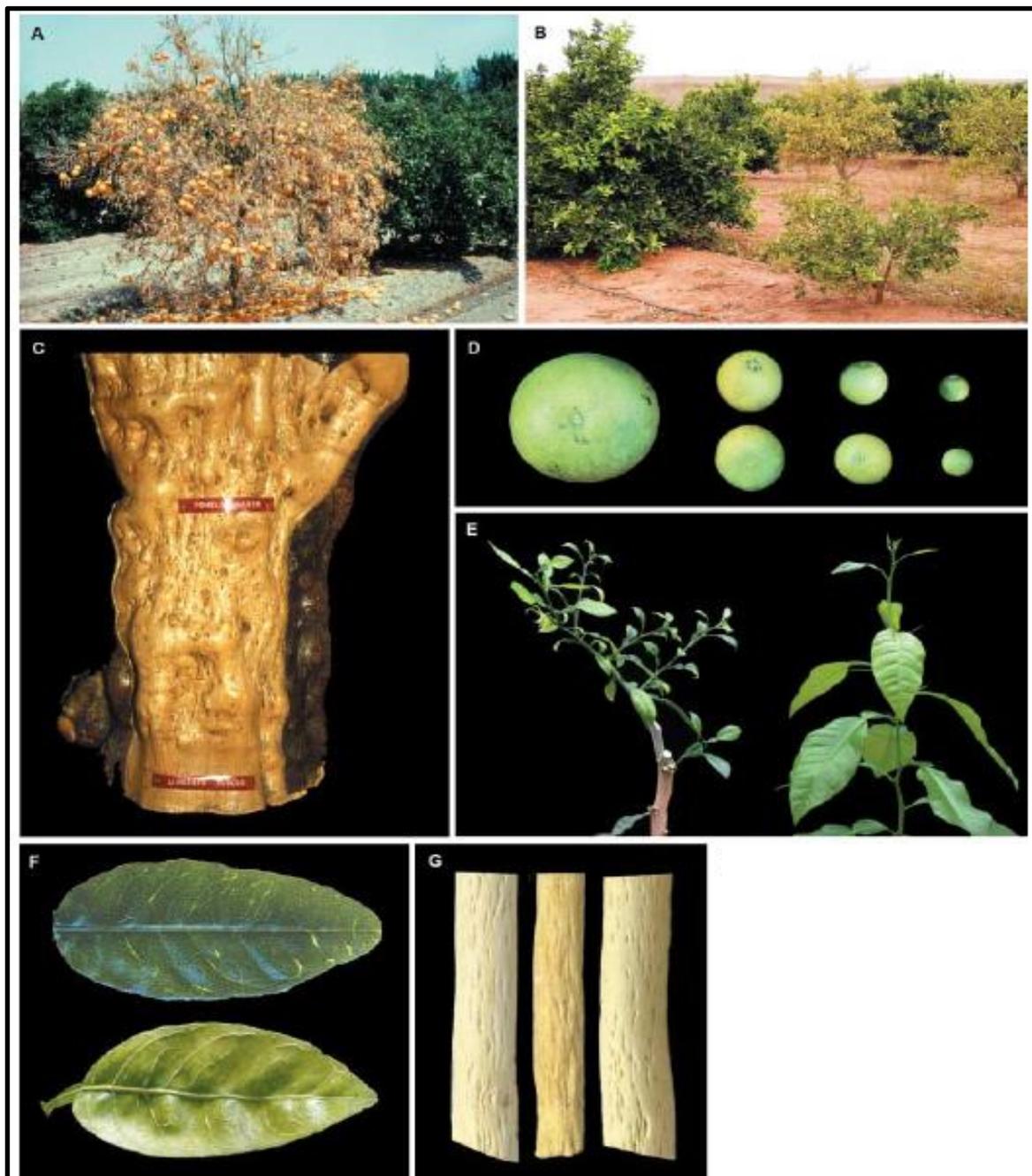
### **1.3. El Vector del Virus de la Tristeza de los Cítricos**

Desde hace varios años, las prácticas de la agricultura moderna han contribuido, en parte, al descubrimiento de nuevos virus emergentes en plantas, siendo los más notables los geminivirus, closterovirus y tospovirus. De manera similar a lo que ocurre con las enfermedades causadas por virus emergentes en animales, varios de los problemas provocados por virus emergentes que afectan plantas, se deben a la distorsión humana de la relación estable existente entre el virus, el vector y su huésped natural (Gray & Banerjee, 1999).

A diferencia de varios arbovirus animales que replican dentro del vector, la mayoría de los virus de plantas transmitidos por artrópodos no replican dentro de éste (Gray & Banerjee, 1999).

CTV es transmitido de manera semi-persistente por distintas especies de áfidos de los géneros *Aphis* y *Toxoptera* (Hemiptera, *Aphididae*). Los virus semi-persistentes son retenidos por días o semanas en el intestino anterior del insecto, a diferencia de los no persistentes que solo quedan en las piezas bucales del animal. El tiempo de adquisición del virus por el vector mientras este se alimenta, así como el tiempo de inoculación del mismo, se encuentra en el orden de segundos o minutos (Gray & Banerjee, 1999). La eficiencia de transmisión del virus aumenta a medida que el tiempo de adquisición es

mayor, sugiriendo que el virus se une de manera estable a ciertos sitios de unión en el intestino anterior y se acumula hasta que estos sitios se saturan (Gray & Banerjee, 1999).



**Figura 1.3.** Síntomas de Tristeza, SP y SY causados por CTV en distintas combinaciones de variedad-pie. A) Síndrome de declinamiento rápido en naranjo dulce injertado sobre naranjo amargo; B) Árboles en diferentes estados de declinamiento rodeados de árboles sin declinamiento (copa verde oscura); C) SP severo en el tronco de un pomelo injertado en *P. trifoliata* (este pomelo llegó a Argentina desde Sudáfrica en una de las primeras importaciones, Museo de la Estación Experimental INTA, Concordia, Entre Ríos); D) Frutos de pomelo injertado en *P. trifoliata* afectados por SP severo. Se observa el pequeño tamaño comparado con un fruto normal (Izquierda); E) Crecimiento atrofiado y hojas pequeñas y amarillentas en plantín de naranjo amargo inoculado con una cepa de CTV que produce SY (izquierda) y planta similar inoculada con un aislado suave de CTV (derecha); F) Aclaramiento de nervaduras en hoja joven de *C. macrophylla* (arriba) y acorchamiento de nervaduras en hoja de Lima Mexicana (abajo), inoculadas con una cepa suave y otra severa de CTV, respectivamente; G) Acanaladuras en la madera en Lima Mexicana. Tomado de Moreno y colaboradores, 2008.

El aparato bucal de los áfidos presenta un estilete tipo aguja que puede penetrar la pared celular ya sea por fuerza mecánica o con la ayuda de enzimas de la saliva o el intestino. Luego, la membrana celular es fácilmente atravesada por fuerza mecánica, pudiendo así alcanzar los contenidos celulares para alimentarse. Este mecanismo no destruye a las células de la planta, lo cual es crucial para la supervivencia del virus (Figura 1.4) (Gray & Banerjee, 1999).



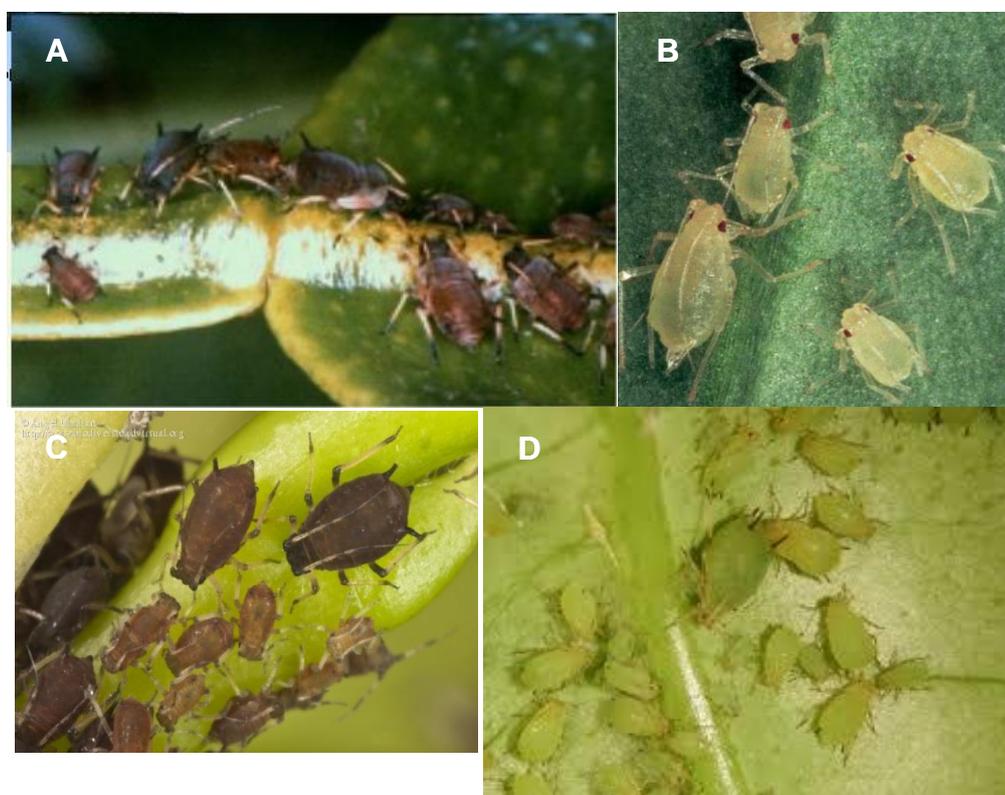
**Figura 1.4.** Micrografía de un corte longitudinal de la cabeza de un áfido alimentándose en una planta. El estilete del áfido protruye de la probóscide (A) atravesando las células del mesófilo (B) hasta el sistema vascular (C). Tomado de Gray & Banerjee, 1999.

El vector más eficiente de CTV es el áfido *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Brlansky *et al.*, 2003) (Figura 1.5A) y se encuentra distribuido en Asia, Australia, África subsahariana, América central y del sur, y algunos países del Caribe (Costa & Grant, 1951; McClean, 1975; Yokomi *et al.*, 1994; Rocha-Peña *et al.*, 1995). También se ha descrito su presencia en el norte de España y Portugal, aunque alejado de las grandes áreas de producción citrícola (Ilharco *et al.*, 2005).

El segundo vector, en eficiencia de transmisión, que le sigue a *T. citricida* es *Aphis gossypii* (Glover) (Figura 1.5B), y es el principal vector de CTV en zonas del Mediterráneo y algunas áreas de América del norte (Cambra & Moreno P, 2000).

Otros áfidos que han sido reportados como vectores de CTV, aunque con menor eficiencia que *A. gossypii*, son *A. spiraecola* (Patch) y *T. aurantii* (Boyer de Foscolombe) (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984) (Figura 1.5C y 1.5D).

El rango de huésped de *T. citricida* se limita al género *Citrus* y otros pocos miembros de la familia *Rutaceae*, mientras que las otras tres especies son polífagas con amplios rangos de huésped, que incluyen miembros de diversas familias de plantas (Carver, 1978).



**Figura 1.5.** A) Colonia de áfidos adultos de *T. citricida*; B) *Aphis gossypii*; C) *T. aurantii*; D) Adultos y ninfas de *A. spiraecola*.

Las poblaciones de *T. citricida* pasan todo su ciclo vital en plantas del género *Citrus*, y se expanden y colapsan con el desarrollo de nuevos brotes estacionales (Gottwald *et al.*, 1996). El ciclo de vida del áfido es polimórfico y pueden generar grandes poblaciones partenogenéticas. Cada descendencia es hembra y producen ninfas luego de la maduración. Cuando la colonia es muy grande o los tejidos del huésped comienzan a morir, se produce un aumento hormonal en los áfidos no alados, lo que lleva a la siguiente generación de áfidos alados. Estos migran a nuevos huéspedes e inician una nueva colonia (Dixon, 1998).

Experimentos realizados por Yokomi y colaboradores (1994) mostraron que *T. citricida* tiene una eficiencia de transmisión de CTV 25 veces mayor que *A. gossypii*. Sin embargo, no todos los aislados de CTV son transmitidos de la misma manera por las distintas

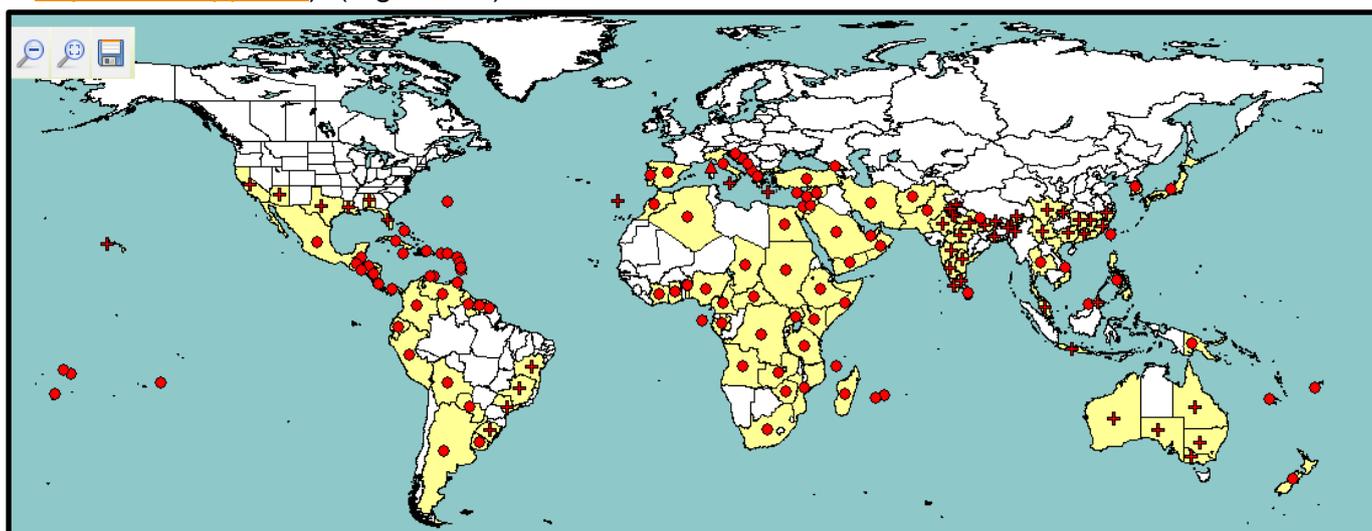
especies de áfidos. La tasa de transmisión es el resultado de varios factores, como la distribución y título viral en el huésped, el asilado de CTV en cuestión, la especie y número de áfidos involucrados, condiciones ambientales y las preferencias alimenticias de los áfidos. Diversos estudios han demostrado que *C. aurantifolia* es la especie elegida por *A. gossypii* para alimentarse, los períodos de alimentación así como los eventos de salivación son largos, lo que asegura una mayor adquisición/eyección del virus (Gutierrez, 2009). También se ha observado, mediante la utilización de virus marcados con GFP (*Green Fluorescence Protein*, Proteína verde fluorescente), una distribución más uniforme en los tejidos del floema en esta especie (Folimonova *et al.*, 2008).

*T. citricida* es capaz de transmitir, en condiciones experimentales, todos los aislados de CTV, incluyendo los más virulentos (Harper *et al.*, 2009).

#### 1.4. Virus de la Tristeza de los Cítricos

El Virus de la Tristeza de los Cítricos es el agente causal de varias enfermedades con efectos dramáticos en la citricultura (Moreno *et al.*, 2008).

En la actualidad, CTV se encuentra distribuido en todas las zonas cítricas del mundo. Es prácticamente endémico en Asia, África, Australia, América del Sur y gran parte de Centroamérica (EPPO (2014) PQR-EPPO *database on quarantine pests*. <http://www.eppo.int>). (Figura 1.6).



**Figura 1.6.** Distribución mundial del Virus de la Tristeza de los Cítricos. En amarillo se muestran los países afectados y se diferencian los registros nacionales (círculos rojos) de los registros regionales (cruces rojas) Tomado de <http://www.eppo.int>

La dispersión de CTV a nuevas regiones ocurre principalmente por movimiento de plantas o por propagación de yemas infectadas. A nivel local, puede ser dispersado por varias especies de áfidos (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Durán-Vila & Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000), previamente mencionadas. La transmisión a través de semillas no ha sido reportada (McClellan, 1957).

#### 1.4.1. Clasificación Taxonómica

Algunos autores ubican a la familia *Closteroviridae* dentro de la superfamilia tipo alfavirus (*alphavirus-like*) que se compone de varias familias de virus ARN de polaridad positiva (Dolja *et al.*, 2006). Según datos del 2011 provenientes del Comité Internacional en Taxonomía Viral ([www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org)), la familia *Closteroviridae* no ha sido asignada dentro de ningún orden. Dentro de esta familia se ubican tres géneros con varias especies cada uno. El género *Ampelovirus* consta de ocho especies, siendo el Virus 3 asociado con el enrollamiento de la hoja de la vid la especie principal o tipo (*Grapevine Leafroll-associated virus 3*). La especie tipo del género *Crinivirus*, el cual contiene doce especies, es el Virus infeccioso de amarillamiento de la lechuga (*Lettuce infectious yellows virus*). El Virus del amarillamiento de la remolacha (*Beet yellows virus*) es la especie principal del género *Closterovirus*. Este género contiene once especies, siendo el Virus de la Tristeza de los Cítricos una de ellas. Por último, existen seis especies más dentro de la familia *Closteroviridae* que aún no han sido asignadas a ningún género (Dolja *et al.*, 2006).

#### 1.4.2. Historia de CTV

Durante muchos siglos, los cítricos se cultivaron a partir de semillas y éstos eran huéspedes asintomáticos para muchos aislados de CTV. Esto sugiere que CTV surgió hace muchos años en las regiones de origen de los cítricos y que co-evolucionó con su huésped (Moreno *et al.*, 2008; Roistacher *et al.*, 2010).

Los cítricos son originarios del sudeste asiático y del archipiélago Malayo. Las rutas probables de movimiento de CTV, que se remontan al siglo XIX mediante el transporte de plantas infectadas en barcos, es de China a Japón, luego a Filipinas, India, Australia y Sudáfrica. En 1956, Wallace y colaboradores reportaron: “Registros encontrados en Sudáfrica indican que 1.400 árboles de naranja *Lue Gim Gong* injertadas en naranjo amargo fueron exportadas a Argentina en julio de 1930, seguido por una exportación un

año después de 250 Navels, 500 Valencias, 350 Lue Gim Gong y 100 Ruby injertadas en limón rugoso” (Wallace *et al.*, 1956). A fines de este siglo, el movimiento de plantas en los barcos se realizaba en enormes cajas Wardian o terrariums, lo que permitió el transporte de la planta completa plantada en la tierra. A su vez, un aumento en el interés de botánicos y comerciantes por los citrus, hizo que miles de plantas fueran llevadas desde Asia a otras regiones y numerosas especies exóticas de cítricos fueron intercambiadas entre coleccionistas (Roistacher, 1981). Probablemente, esto representó el primer gran movimiento de CTV de su región de origen a otros países, donde ocurrió la interacción del virus con nuevas variedades y combinaciones de cítricos bajo diferentes condiciones ambientales (Moreno *et al.*, 2008). Sin embargo, no solo las plantas de cítricos fueron transportadas en los terrariums a distintas regiones del mundo, sino también insectos vectores de CTV así como distintas especies de oomycetes del género *Phytophthora* (Roistacher *et al.*, 2010).

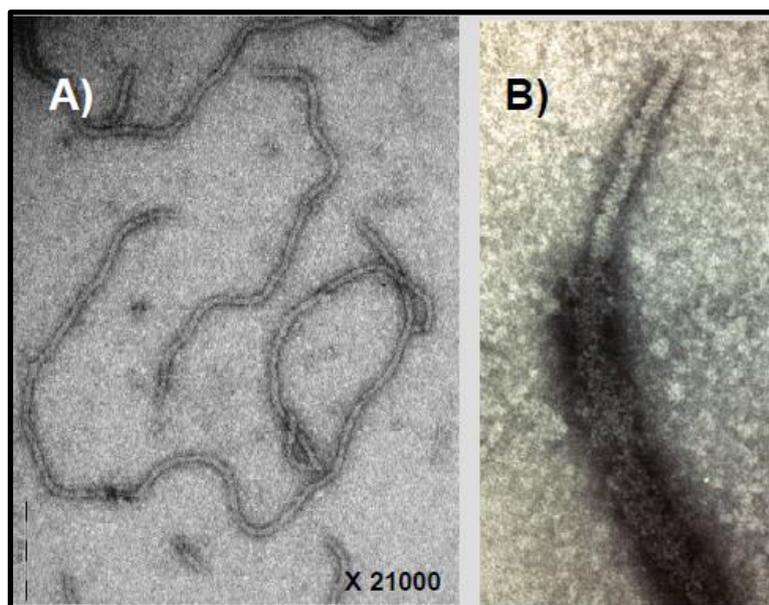
El advenimiento del cultivo de cítricos para su comercialización produjo dos grandes cambios en la citricultura de la época. En 1836 ocurre un cambio importante en el modo de cultivo de los cítricos, debido a la aparición de una nueva enfermedad producida por oomycetes del género *Phytophthora*. Esta enfermedad aparece inicialmente en las Azores y luego se dispersa al resto de las regiones citrícolas, provocando la muerte de miles de árboles injertados en naranja dulce (Zaragoza, 2007; Roistacher *et al.*, 2010). Este desastre lleva a la adopción del naranja amargo como portainjerto para la propagación de las variedades cítricas, debido a su resistencia a *Phytophthora* y a sus buenas cualidades agronómicas, tales como, alta adaptación a distintos tipos de suelo, buena producción y calidad de fruta (Moreno *et al.*, 2008). Es así que el naranja amargo se convierte en el patrón por excelencia en el Mediterráneo y luego en las Américas.

El uso de naranja amargo como portainjerto fue crítico para el desarrollo de la citricultura del siglo XX, pero también creó las condiciones para que una nueva enfermedad, desconocida por los productores, causara desastres. Esta nueva dolencia, llamada Tristeza, fue el resultado directo de la interacción de CTV con nuevos huéspedes sensibles, comercialmente creados, al propagar variedades de naranja dulce, mandarina o pomelo sobre naranja amargo. Varias epidemias ocurrieron y las más destructivas fueron en Argentina (1930), Brasil (1937), California (1939), Florida (1951), España (1957), Israel (1970) y Venezuela (1980), aunque numerosos brotes importantes fueron reportados en Chipre (1989), Cuba (1992), México (1995), República Dominicana (1996) e Italia (2002)

(Bar-Joseph *et al.*, 1989; Gottwald *et al.*, 1998, 2002; Durán-Vila & Moreno, 2000; Garnsey *et al.*, 2000; Timmer *et al.*, 2000; Davino *et al.*, 2003). Más de 100 millones de árboles fueron devastados, de los cuales, más de 20 millones se encontraban en el sur del continente americano (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Moreno *et al.*, 2008).

### 1.4.3. Estructura de CTV

CTV forma largas partículas flexuosas y filamentosas con un tamaño de 2000 x 11 nm (Gonsalves *et al.*, 1978) encontrándose entre los virus de plantas más grandes conocidos hasta el momento (Karasev *et al.*, 1995) (Figura 1.9A). La cubierta del virus está formada por dos proteínas de cápside, una de 25 kDa (p25, CP) que cubre aproximadamente el 95% de la longitud del virión, y otra de 27 kDa (p27, CPm) que cubre el 5% restante (Ayllon *et al.*, 2001) (Figura 1.9B). No presenta envoltura derivada de la célula huésped (Karasev *et al.*, 1995).

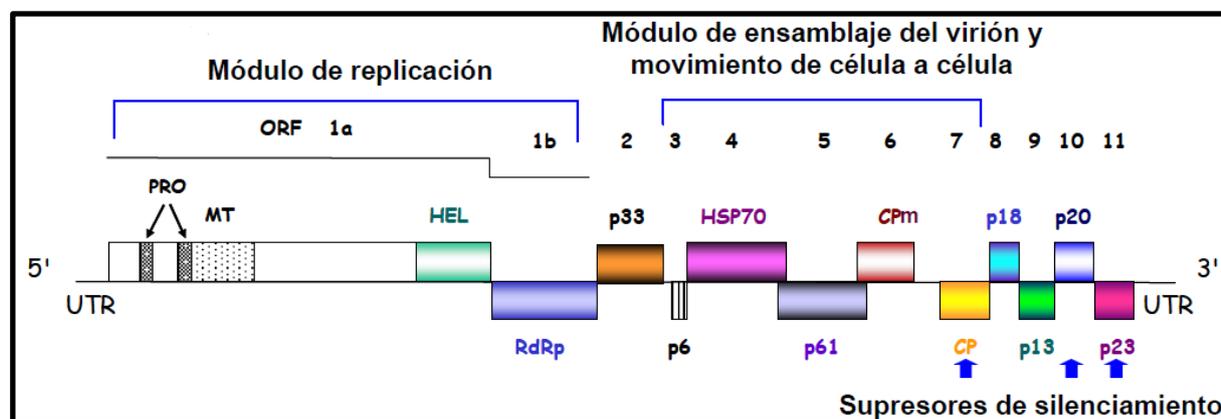


**Figura 1.9.** Micrografías electrónicas de viriones purificados de CTV procedentes de *L. mexicana* infectada. A) Tinción negativa con acetato de uranilo al 1% B) Ausencia de reacción con anticuerpos específicos de la CP en el extremo 5' de las partículas de CTV. Tomado de Ruiz-Ruiz, 2009.

### 1.4.4. Organización genómica

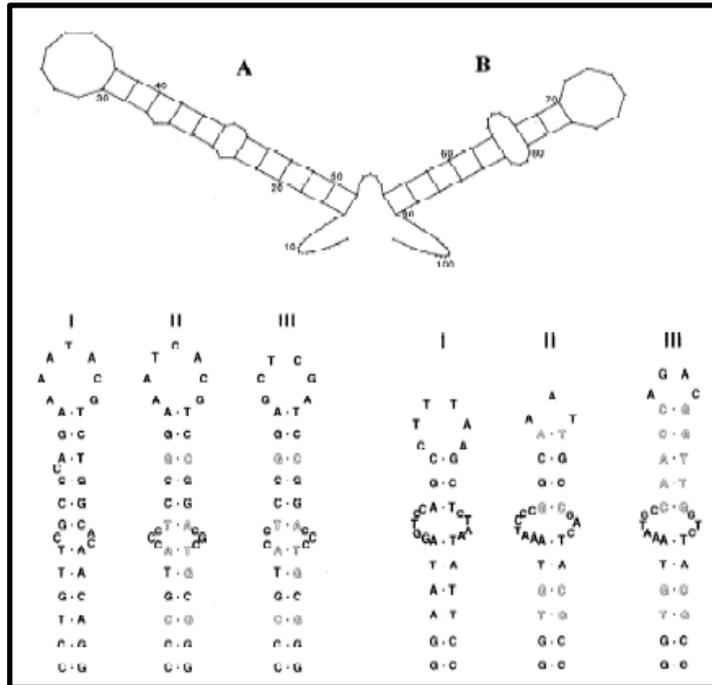
El genoma viral está compuesto por una única molécula de ARN simple hebra de polaridad positiva, cuyo largo varía entre 19226 y 19296 nucleótidos, dependiendo del aislado (Ayllon *et al.*, 2001). Presenta 12 marcos abiertos de lectura (*Open Reading*

Frames, ORF's) flanqueados por dos regiones no traducidas (*Non-Translated Regions*, NTR) en los extremos 5' y 3' de 107 y 273 nucleótidos, respectivamente (Karasev *et al.*, 1995). Estas regiones se caracterizan por presentar estructuras secundarias complejas involucradas en la replicación viral (Figura 1.10).



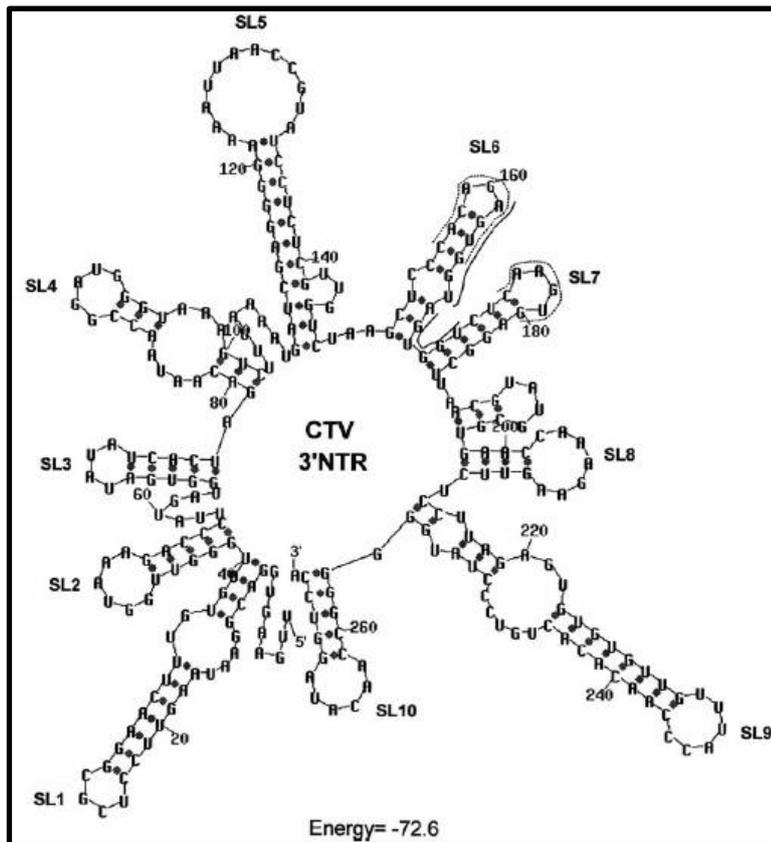
**Figura 1.10.** Representación gráfica de la organización del genoma de CTV. Se muestran los ORF con sus respectivos productos proteicos, así como los dominios homólogos de metiltransferasa (MT), proteasa (PRO) y helicasa (HEL). Se indican también los extremos 5' y 3' no traducidos (Tomado de Ruiz-Ruiz, 2009).

La región 5' UTR participa en la unión de los ribosomas para la traducción del ORF 1, de la que resulta la replicasa viral que se encarga de replicar el genoma y producir los RNAs subgenómicos (sgRNAs) de los ORF 2 a 11 para la expresión de las demás proteínas virales. Esta región es la más variable de todo el genoma llegando a tener en ocasiones valores de identidad nucleotídica menores al 50% entre las diferentes estirpes. Éste aspecto de la región 5' UTR ha permitido diferenciar y clasificar a CTV en tres grupos (I, II y III) con una identidad de secuencias intra-grupo superior al 88% y con identidades inter-grupo del 55-57% entre los grupos I y II, 62-64% entre los grupos II y III, y 44-45% entre los grupos I y III (López *et al.*, 1998). La estructura secundaria de mínima energía más estable predicha para los tres grupos, es muy similar y consiste en dos bucles separados por una pequeña región espaciadora (Figura 1.11).



**Figura 1.11.** Estructura secundaria de mínima energía predicha por el programa MFOLD para la región 5' UTR del aislado T36 (arriba). Estructura secundaria de los bucles/tallos A (izquierda) y B (derecha) de las secuencias 5' UTR de los grupos I (T36), II (VT) y III (T317) de CTV. En negrita se indican las mutaciones respecto a la secuencia de T36 que mantiene la estructura de los bucles/tallos A y B (Tomado de López *et al.*, 1998).

Por otro lado, la región 3' UTR es la más conservada de todo el genoma viral y está implicada en el reconocimiento de la ARN polimerasa como ocurre en otros virus de plantas (Gallie & Kobayashi, 1994). Aunque en esta región no se han encontrado estructuras tipo poli A o tipo tRNA, como las utilizadas por otros virus para estabilizar y proteger los genomas de la acción de nucleasas, se ha descrito la presencia de una compleja estructura secundaria compuesta por 10 horquillas que probablemente cumple la misma función (Pappu *et al.*, 1994; Satyanarayana *et al.*, 2002a) (Figura 1.12).



**Figura 1.12.** Estructura secundaria de mínima energía libre predicha con el programa MFOLD para la región 3' UTR del aislado T36 de CTV. Las 10 horquillas independientes que se observan se indican como SL1 a SL10 (Tomado de Satyanarayana *et al.*, 2002a).

#### 1.4.5. Proteínas Virales

Está ampliamente aceptada la premisa de que todos los virus de plantas no defectivos deben codificar proteínas con al menos tres funciones: replicación, encapsidación del genoma y movimiento a corta y larga distancia, Sin embargo, recientemente se ha propuesto la supresión del silenciamiento por ARN interferencia como una cuarta función universal en virus de plantas (Baulcombe, 2004).

Las proteínas de CTV se encuentran representadas en distintas proporciones en el virión. Cada una de ellas posee al menos una función, pudiendo ser estructural, de replicación, de movimiento, e incluso de regulación de la expresión del sistema de defensa del huésped. A continuación se realizará una descripción de cada una de ellas.

#### **1.4.5.1. Proteínas del Módulo de Replicación**

Como ocurre en todos los virus de ARN con polaridad positiva, las proteínas del módulo de replicación, que corresponden al extremo 5' del genoma viral, se expresan directamente del ARN del virión (Karasev *et al.*, 1989).

Los ORF 1a y 1b forman lo que se conoce como el “módulo de replicación”, ya que sus productos son requeridos para la replicación viral (Tatieni *et al.*, 2008). El ORF 1a codifica una poliproteína de 349 kDa que incluye dominios papaín-proteasa (PRO), helicasa (HEL) y metiltransferasa (MET). La función de la proteasa es el clivaje de la poliproteína para producir sus componentes por separado (Karasev *et al.*, 1995). El producto del ORF 1b es una ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) de 57 kDa y se expresa vía un desfasaje de tipo +1. Los ORF 1a y 1b ocupan la mitad 5' del genoma de CTV (Karasaev *et al.*, 1995).

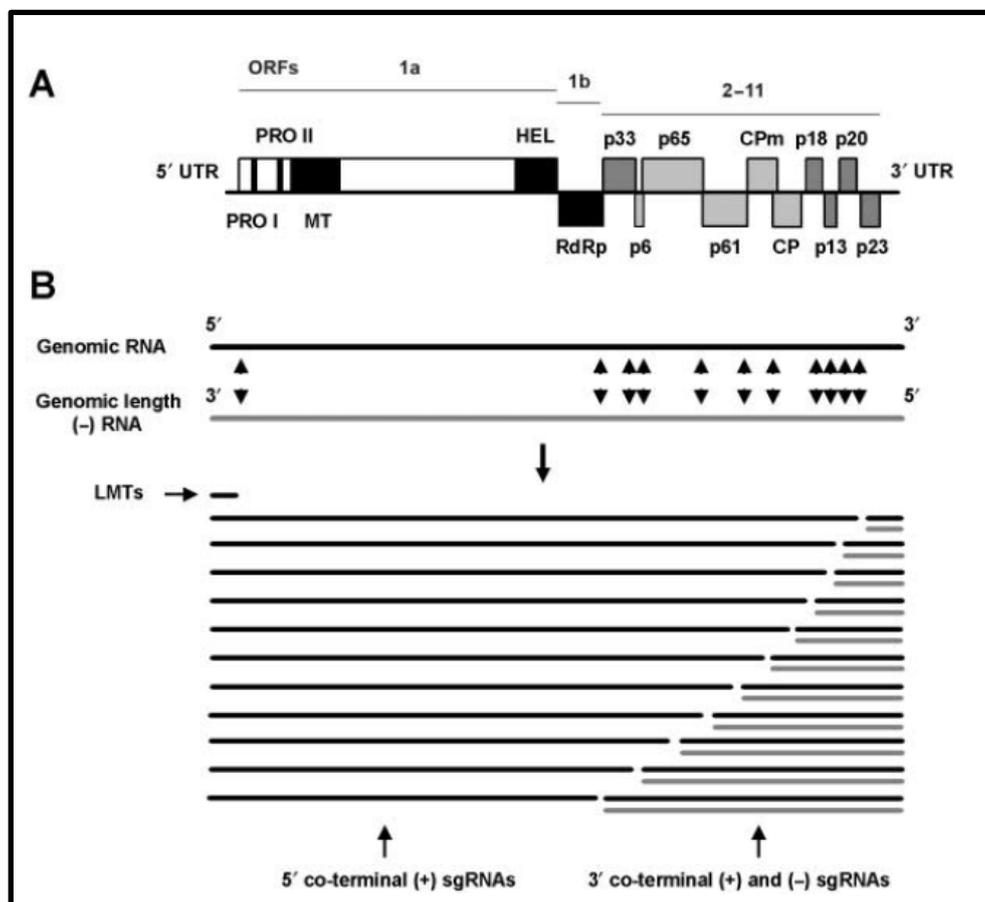
#### **1.4.5.2. Proteínas del Módulo de Ensamblaje y Movimiento**

Los 10 ORF's de la mitad 3' del genoma forman lo que se conoce como “módulo de ensamblaje y movimiento”. Los genes p6, p65, p61, p27 y p25 (ORFs 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente) forman un bloque de cinco genes que está conservado en todos los miembros de la familia *Closteroviridae*; el gen p20 (ORF 10) es homólogo al gen p21 de BYV, y los genes p33, p18, p13 y p23 (ORFs 2, 8, 9 y 11) no presentan homólogos en otros closterovirus (Dolja *et al.*, 2006) (Figura 1.10).

Los distintos genes de este módulo son expresados a través de sgRNAs, estrategia utilizada por numerosos virus de ARN de polaridad positiva que les permite regular la producción de las diferentes proteínas virales (Figura 1.13). A su vez, CTV produce una gran cantidad de sgRNAs negativos comparado con otros miembros del subgrupo alfa virus, aunque las razones de ello aún son desconocidas (Satyanarayana *et al.*, 2002) (Figura 1.13).

El gen p6 codifica para una proteína hidrofóbica de anclaje a membrana, que podría estar involucrada en funciones de movimiento, ya que su homóloga en BYV presenta esta función (Satyanarayana *et al.*, 2000; Peremyslov *et al.*, 2004). HSP70h, codificada por el gen p65, es una proteína homóloga a las proteínas de choque térmico (*Heat Shock Protein*, HSP) de plantas de la familia HSP70 y al momento, solamente los miembros de la

familia *Closteroviridae* codifican este tipo de proteínas (Satyanarayana *et al.*, 2000). El producto de p61 muestra cierta homología con otra proteína celular, la HSP90, y ha sido sugerido que puede funcionar de manera sinérgica con HSP70h. Según Satyanarayana y colaboradores, HSP70h, p61, p25 y p27 son esenciales para que ocurra el correcto ensamblaje del virión, ya que funcionarían como “chaperonas moleculares” (Satyanarayana *et al.*, 2000). Se observó en el asilado T36 de Florida, que en ausencia de p65 y p61, la proteína CPm puede cubrir más del 5% del extremo 5' del genoma o incluso el genoma completo (Satyanarayana *et al.*, 2004).



**Figura 1.13.** Esquema del mecanismo de expresión del genoma de CTV. Tomado de Moreno y colaboradores. 2008.

Un síntoma característico de la infección por Closterovirus es la formación de cuerpos de inclusión en células del floema de las plantas infectadas (Gowda *et al.*, 2000). En un estudio, realizado por Gowda y colaboradores (2000), se observó que p20 tiene una alta afinidad por sí mismo y que es el principal componente de los cuerpos de inclusión en las células del floema. Por otro lado, p20, junto con p23 y p25, actúan como supresores de

silenciamiento mediado por ARN interferencia, con p23 inhibiendo el silenciamiento intracelular, p25 el silenciamiento intercelular y p20 ambos (Lu *et al.*, 2004).

p23 es el último gen del extremo 3' del genoma y codifica para una proteína de 23 kDa que une específicamente ARN de manera cooperativa. Esta proteína se acumula en etapas tempranas de la replicación viral y es la responsable del control de la acumulación asimétrica de ARNs de ambas polaridades durante la replicación y transcripción del genoma viral (López *et al.*, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2002b) (Figura 1.13). Además, p23 es un determinante de patogenicidad. Ghorbel y colaboradores (2001) confirmaron la capacidad patogénica de p23 expresándola en plantas transgénicas de Lima Mexicana, las cuales mostraron síntomas severos de CTV al igual que plantas no transgénicas infectadas con CTV. Por otro lado, plantas transformadas con una versión truncada de p23 mostraron fenotipo normal (Fagoaga *et al.*, 2005). Ensayos de mutagénesis deletérea en p23 han demostrado que esta proteína es fundamental para la acumulación asimétrica de sgRNAs de sentido positivo y negativo (Satyanarayana *et al.*, 2002), mientras que Lu y colaboradores (2004) sugieren que p23 forma parte de la maquinaria dirigida contra los mecanismos de defensa del huésped mediados por ARN interferencia.

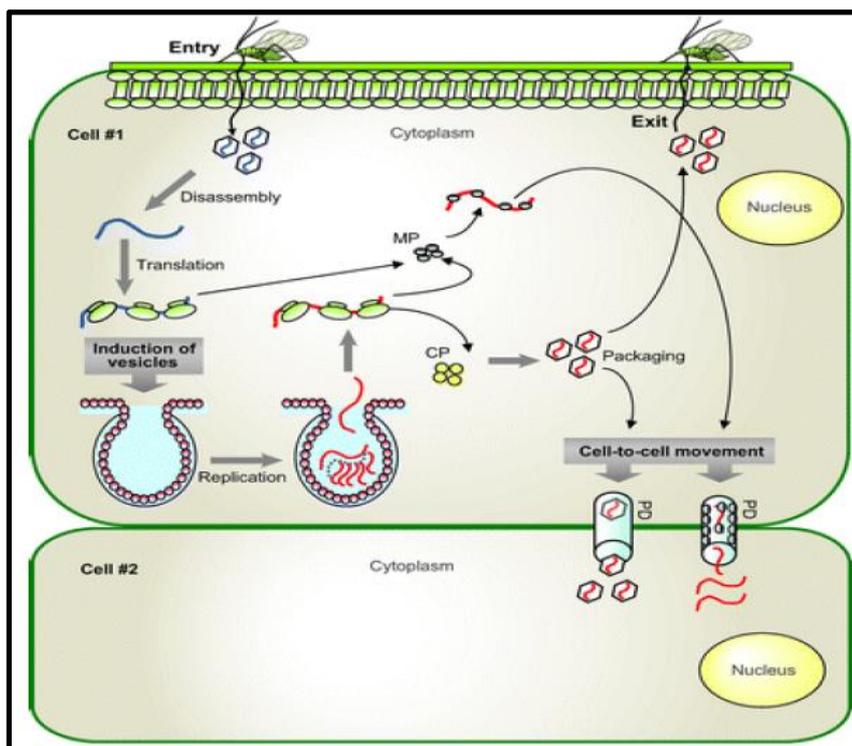
En el 2008, Tatiene y colaboradores descubrieron la función de los genes p33, p18 y p13, genes no relacionados con otros genes del resto de la familia *Closteroviridae*. Mediante delección de uno o más de estos genes, en distintas combinaciones, e inoculándolos en distintos tipos de huéspedes, observaron que estos genes estaban involucrados en el movimiento a larga distancia en distintos tipos de huéspedes. p33 es indispensable para producir una infección sistémica en árboles de naranjo amargo o limón. A su vez, p33 con p18 se necesitan para infectar árboles de pomelo y p13 para la infección de plantas de naranjo chino (*Citrofortunella mitis*). Por lo tanto, estos tres genes son indispensables para la infección sistémica del rango de huésped completo de CTV, pero diferentes genes actúan en diferentes huéspedes (Tatiene *et al.*, 2008, 2011). Por otro lado, se ha demostrado que la falta de p33 elimina la habilidad del virus de excluir una superinfección por el mismo virus u otro estrechamente relacionado (Folimonova, 2012).

#### 1.4.6. Ciclo de Replicación Viral

Como se describió previamente, CTV es inoculado en plantas vía áfidos. El inicio del ciclo de replicación, luego de que el virus ingresa a la célula, requiere el desensamblaje del virión seguido de la traducción del genoma viral. La traducción del genoma viral está a cargo de ribosomas celulares, que son reclutados por los productos de la poliproteína, como la proteasa y otros componentes de replicación, que se encargan de formar los complejos de replicación, y reclutar hacia allí más ribosomas y el ARN viral. Aquí ocurre la síntesis del genoma completo de polaridad negativa, que luego es utilizado como molde para la producción del genoma de polaridad positiva y los ARN subgenómicos. Las cantidades y momentos específicos de síntesis de los sgRNAs está regulada por p23 para optimizar eventos subsiguientes del ciclo infeccioso. Los primeros sgRNAs sintetizados son los que codifican para los supresores del silenciamiento por ARN interferencia, p20, p23 y p25, para contrarrestar el potente sistema de defensa del huésped. La traducción de los genomas nacientes resulta en la proliferación de complejos de replicación, seguido por el ensamblaje de los viriones, que es activado por la acumulación de proteínas estructurales (Medina *et al.*, 1999) (Figura 1.14).

Se sugiere que la principal razón para la acumulación de grandes cantidades de viriones en las células infectadas, facilitaría la adquisición y transmisión de los virus por el áfido. Sin embargo, no todos los viriones producidos se acumulan sino que una subpoblación de ellos comienza el proceso de movimiento célula a célula vía plasmodesmos (PD) y posterior transporte sistémico a través del floema. Se ha visto que HSP70h se acumula en los PD, sugiriendo una función moduladora al interactuar con la miosina y los viriones al momento de la translocación (Medina *et al.*, 1999).

.Las etapas de expresión y replicación del genoma, ensamblaje y movimiento célula a célula llevan aproximadamente un día cada una, y son repetidos consecutivamente hasta que la infección alcanza células con PD con conexión al floema. A partir de aquí, el virus puede lograr una infección generalizada de la planta, alcanzando raíces, hojas y tallos. Este proceso lleva algunos meses para el caso de plantas leñosas como los cítricos.



**Figura 1.14.** Esquema del ciclo viral de CTV. Tomado de Rao, 2006.

#### 1.4.7. Métodos de Control de la Enfermedad

Las posibilidades de controlar los daños causados por CTV incluyen un amplio abanico de medidas que varían según la incidencia de CTV, los aislados del virus y las variedades de cítricos predominantes de cada zona específica (Garnsey et al., 1998).

Las medidas preventivas tienden a evitar la infección o a reducir la difusión del patógeno. Entre éstas están el control sanitario del material vegetal propagativo mediante programas de saneamiento, cuarentena y certificación, y la erradicación de plantas infectadas o el control de los vectores (Ruiz-Ruiz, 2009. Tesis Doctoral).

En países o áreas cítricas donde CTV no se ha establecido, se recomienda la utilización de programas de cuarentena y certificación del material a propagar, complementado con un programa de saneamiento de variedades, en caso que se desee propagar cultivares locales de los que no haya material con garantía sanitaria en bancos de germoplasma internacionales (Navarro et al., 2002).

Cuando el virus se ha introducido en una zona cítrica en la que el patrón predominante es el naranjo amargo, pero su incidencia es aún muy baja, se puede establecer un programa de erradicación de árboles infectados que retrase el avance o

erradique la enfermedad. Programas de este tipo se han aplicado en el Valle Central de California, EEUU (Dodds & Lee, 1991), Israel (Bar-Joseph et al., 1974) y Chipre (Kyriakou et al., 1996).

Cuando la erradicación no es posible debido a la eficiente dispersión de CTV por vectores, la única forma de evitar el decaimiento es la utilización de patrones tolerantes como *P. trifoliata* y sus híbridos citrangeros Troyer y Carrizo. Esta solución es suficiente en algunas áreas cítricas donde predominan aislados poco agresivos, ya que en presencia de éstos, los naranjos dulces, mandarinos y pomelos injertados sobre patrones tolerantes permanecen asintomáticos. Sin embargo, en áreas cítricas donde predominan aislados más virulentos, estas mismas especies, en particular, los pomelos y los naranjos dulces muestran enanismo, SP, baja producción y fruta pequeña, independientemente del patrón sobre el que están injertados (Roistacher et al., 1988; Koizumi, 1991; Broadbent et al., 1991). Para evitar los daños producidos por CTV en estas condiciones, se requieren dos medidas adicionales: tener buenos programas de saneamiento y certificación de material e implementar un programa de protección cruzada (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987). La protección cruzada se describe como un fenómeno en el que una planta muestra resistencia completa o parcial a una cepa de un virus, luego de haber sido infectada con una cepa suave o atenuada del mismo virus (Gal-On & Shibolet, 2005; Yoon et al., 2006).

Actualmente, la protección cruzada se ha desarrollado con éxito en varios países altamente competentes en el mercado exportador. En Brasil, el programa comenzó en 1960 y se lograron liberar 8 millones de árboles protegidos, que luego de 40 años siguen produciendo fruta de buena calidad sin que se haya quebrado la resistencia. La situación es similar en Sudáfrica, principal país exportador del sur. La protección cruzada implementada en algunas variedades comenzó en 1984 y continúa funcionando hasta la fecha. En Perú el sistema funciona desde hace 21 años, y en países como Argentina, Japón, Australia e India ya han logrado la identificación de cepas suaves, las cuales se encuentran en etapa de prueba (Roistacher et al., 2010).

Para que la protección cruzada funcione correctamente se deben utilizar variantes suaves provenientes de la misma región geográfica y perteneciente al mismo genotipo de la variante severa que se desea controlar, así como también la especificidad relacionada a la variante cítrica (Folimonova, et al., 2010). Folimonova (2013) detalló las etapas necesarias para lograr el desarrollo eficiente de un programa de Protección Cruzada.

Como primer paso es necesario identificar el genotipo del aislado severo que necesita ser controlado. Luego debe encontrarse un aislado suave de ese genotipo para ser utilizado como aislado pre inmunizador de plantas de las variedades comerciales de interés, o también se puede atenuar una cepa severa aislada en la zona de interés, en el caso de no detectar cepas suaves. Una nueva técnica para crear aislados de CTV con capacidad protectora está en etapa de prueba, y consiste en el pasaje de aislados severos de CTV por *Passiflora gracilis* o *P. caerulea* usando áfidos (Rostacher *et al.*, 2010).

Se han propuesto otras técnicas alternativas a la protección cruzada, como el silenciamiento por ARN interferencia o la utilización de genes de resistencia a virus presentes en las plantas. El primer mecanismo consiste en producir plantas transgénicas, a las cuales se les incorporan fragmentos del genoma del virus a controlar, desatando el mecanismo de interferencia por ARN. Este proceso inducido por ARN doble cadena (dsRNA), forma parte del sistema natural de defensa de las plantas y degrada de forma específica los ARNs virales (Covey *et al.*, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997, 1999; Hammond *et al.*, 2000). La segunda técnica se trata de incorporar genes de resistencia a CTV mediante cruzamientos convencionales en variedades cítricas comerciales (Yang *et al.*, 2001, 2003; Rai, 2006). Sin embargo, los resultados no han sido prometedores, ya que los ensayos de transformación con distintas regiones del genoma de CTV, como el gen CP (Domínguez *et al.*, 2002), el gen p23 (Ghorbel *et al.*, 2001; Fagoaga *et al.*, 2005), o una construcción en horquilla de la región 3' UTR y parte del gen p23 en ambos sentidos, separadas por un intrón (Batuman *et al.*, 2006), las líneas transgénicas obtenidas: i) eran totalmente susceptibles, ii) presentaban un retraso en la infección y en la expresión de síntomas, o iii) un 20-30% de las propagaciones eran inmunes a la infección, mientras que las demás eran totalmente susceptibles. Por otro lado, la incorporación de genes de resistencia a CTV a variedades comerciales no ha sido posible debido a la compleja biología reproductiva de los cítricos.

#### **1.4.8. Evolución de CTV**

Los dos mecanismos principales de evolución de CTV son la mutación, por la falta de actividad correctora de pruebas de la RNA polimerasa viral, y la recombinación. Se ha calculado la tasa de evolución correspondiente al gen CP,  $1.73 \times 10^{-4}$  cambios nucleotídicos por sitio por año (Silva *et al.*, 2012), así como también la que corresponde al gen p20 ( $1.45 \times 10^{-4}$  nucleótidos/sitio/año) (Davino *et al.*, 2013). Recientemente, Harper (2013) calculó

una tasa de  $6.67 \times 10^{-5}$  cambios nucleotídicos por sitio por año utilizando genomas completos. Esto demuestra que CTV es un virus relativamente estable, con una baja tasa de evolución comparado con otros virus RNA.

Por otro lado, se ha constatado que la recombinación es un factor muy significativo en la evolución de CTV (Martin *et al.*, 2009), que produce variantes con propiedades potencialmente diferentes a las de los aislados parentales (Sztuba- Solinska *et al.*, 2011). Uno de los primeros genomas secuenciados de CTV, el SY568 (Yang *et al.*, 1999) es recombinante (Vives *et al.*, 1999, 2005), como lo es B165 (Roy & Brlansky, 2010), HA16-5 (Melzer *et al.*, 2010), Kpg3 (Biswas *et al.*, 2012), todos los miembros del grupo RB y NZ-M16 (Harper *et al.*, 2010) y los genotipos T68 (Harper, 2013). Se ha propuesto que los sitios calientes (*hotspots*) donde ocurre la recombinación, estarían ubicados entre el ORF1b y p33 (Vives *et al.*, 1999; 2005; Hilf, 2010) o en p65, sitio presente en todas las cepas del grupo RB (Harper *et al.*, 2010).

#### **1.4.8.1. Transmisión de poblaciones de CTV**

La transmisión por áfidos juega un rol fundamental en el establecimiento y mantenimiento de una de las características menos comprendidas en las infecciones por CTV, las poblaciones (Harper, comunicación personal).

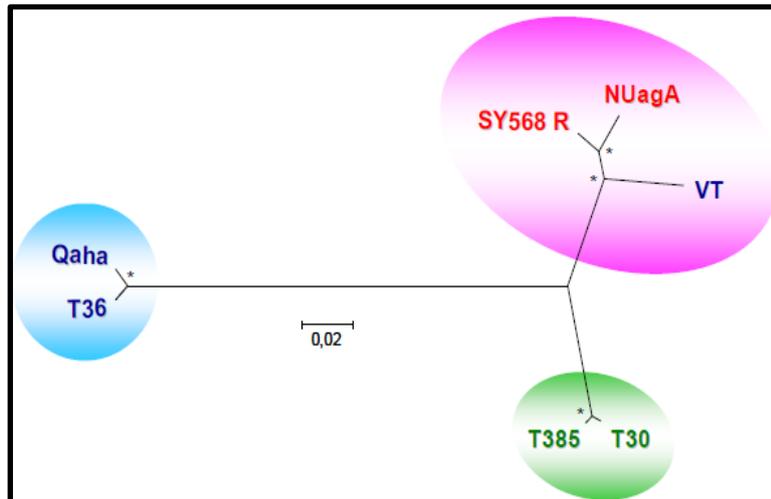
Las poblaciones de CTV, que comprenden todas las cepas, genotipos y variantes de secuencia presentes en un único individuo, presentan dos niveles de complejidad. El primero está formado por los genotipos o cepas existentes. Al momento se han descrito al menos seis genotipos, inicialmente establecidos por la divergencia entre ellos del ORF1a o en algunos casos, por la expresión de fenotipos específicos (Hilf *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2010; Melzer *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010), aunque aislados individuales que pertenecen a un genotipo pueden producir fenotipos y severidad de síntomas diferente (Hilf *et al.*, 2005). Recientemente, Harper (2013) mediante el estudio de genomas completos, obtuvo la misma clasificación en seis genotipos previamente descrita por secuencias parciales. Las mezclas son una parte importante en la expresión de síntomas, ya que la presencia de más de un genotipo o cepa puede modificar la severidad de los síntomas o retrasar la aparición de los mismos. Además, la coexistencia de diferentes genotipos en un mismo individuo es fundamental para que ocurra uno de los mecanismos más importantes para la evolución de CTV, la recombinación (Weng *et al.*, 2007).

El segundo nivel de complejidad está formado por las variantes de secuencia minoritarias en torno a una secuencia maestra, que fueron formadas por eventos de mutación durante la replicación, llamadas cuasiespecies (Albiachi-Martí *et al.*, 2000b). La transmisión por áfidos juega un papel crucial en la evolución de las cuasiespecies, ya que fuerza a las poblaciones a pasar por cuellos de botella, transmitiendo efectivamente una pequeña proporción de la diversidad de la cuasiespecie (d'Urso *et al.*, 2000; Schenider & Roossinck, 2001; Moreno *et al.*, 2008). Desde el punto de vista experimental, la transmisión por áfidos ha sido crucial para la separación de genotipos en las poblaciones de CTV (Ayllon *et al.*, 1999; d'Urso *et al.*, 2000; Brlansky *et al.*, 2003; Sambade *et al.*, 2007; Roy & Brlansky, 2009).

#### **1.4.8.2. Evolución y variabilidad genética del Virus de la Tristeza de los Cítricos**

Con la excepción del *Grapevine leafroll virus-3*, CTV es la única especie de closterovirus que posee múltiples cepas filogenéticamente diferentes (Moreno *et al.*, 2008).

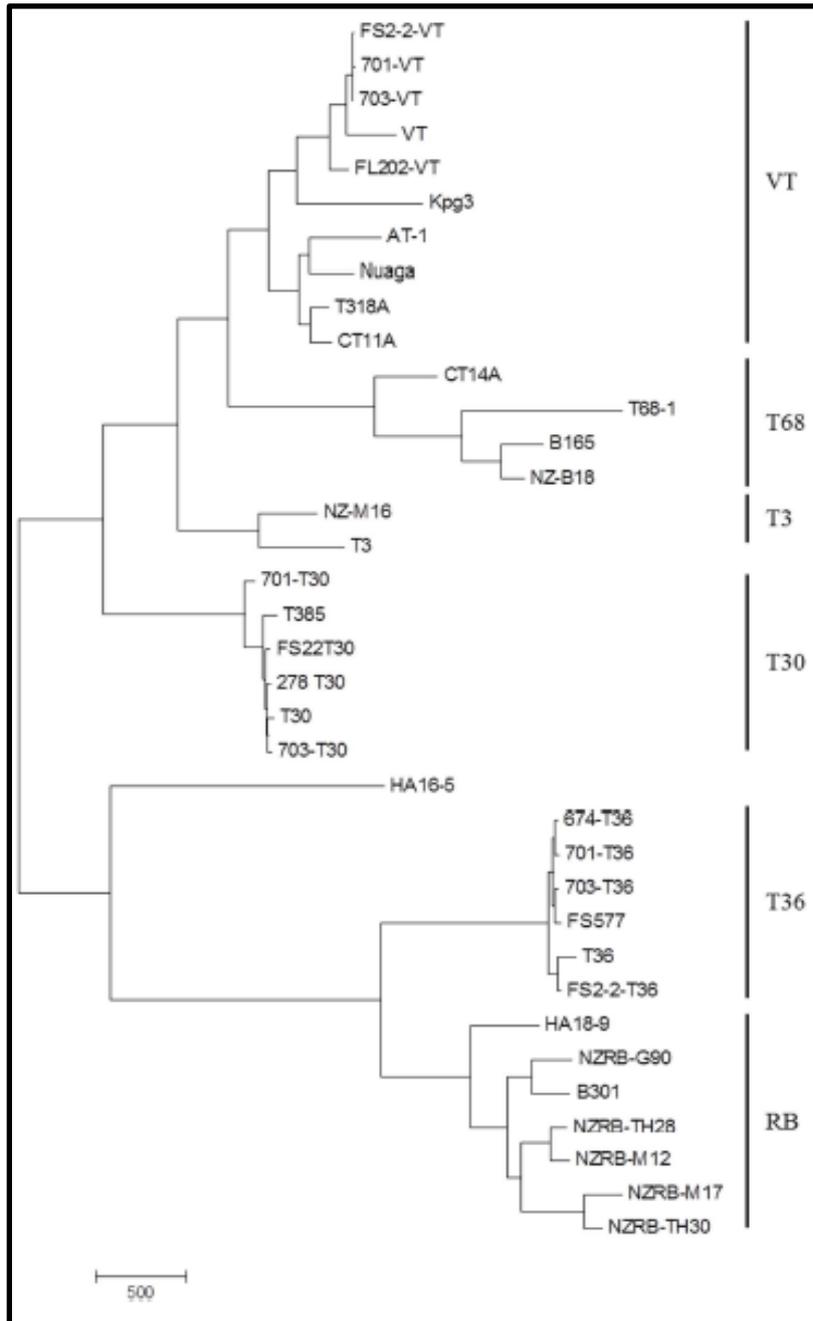
Existe un gran debate en la comunidad científica, respecto a la clasificación de CTV. Con la secuenciación de los primeros genomas de CTV se estableció una clasificación en tres grupos, haciendo referencia a la severidad de las cepas en cuestión, diferenciándolos en aislados severos, intermedios y suaves. Los aislados utilizados fueron T36 (Pappu *et al.*, 1994; Karasev *et al.*, 1995) y T30 (Albiach-Martí *et al.*, 2000a) de Florida, EEUU, VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 (Vives *et al.*, 1999) de España, SY568 (Yang *et al.*, 1999; Vives *et al.*, 2005) de California, EEUU, NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001) y Qaha de Egipto (número de acceso de Genbank AY340974). Los aislados T385 y T30 son esencialmente asintomáticos, T36 causa los síndromes Tristeza y SY, VT induce Tristeza, SY y de forma ocasional SP suave en pomelo, SY568 y NUagA causan síntomas intensos en lima Mexicana y otros huéspedes. Los síntomas que induce el aislado Qaha no han sido descritos (Vives *et al.*, 1999, 2005; Albiach-Martí *et al.*, 2000a). El análisis filogenético de las siete secuencias completas mostraron tres grupos principales que incluían: i) los aislados virulentos SY568R, NUagA y VT, inductores de SP en naranjo dulce o pomelo, ii) los aislados asintomáticos T30 y T385 y iii) los aislados T36 y Qaha. Las identidades nucleotídicas dentro de cada grupo fueron superiores al 97.5%, mientras que la identidad más baja se daba entre los aislados VT y Qaha (75.6%) (Figura 1.15) (Ruiz, 2009).



**Figura 1.15.** Árbol filogenético obtenido con el método *Neighbor-Joining* con un apoyo de 1000 bootstraps, a partir de secuencias completas de CTV. (\*) Nodos detectados en el 90- 100% de las réplicas. Tomado de Ruiz-Ruiz, 2009.

Otras regiones, como la 5'UTR (Ayllon *et al.*, 2001) o el gen p23 (Sambade *et al.*, 2003), han sido utilizadas para análisis filogenéticos de las poblaciones de CTV. Otros trabajos, como el de Iglesias y colaboradores (2008), utilizaron varias regiones simultáneamente (p23, p25 y p27) para clasificar al virus en aislados suaves, intermedios y severos.

Sin embargo, algunos autores sostienen que, dada la gran capacidad de recombinación que presenta CTV, la falta de asociación genotipo/fenotipo y que pequeñas diferencias de secuencia pueden alterar la patogenicidad de la cepa, una clasificación basada en fenotipos, como cepas "SY" o "SP" o cepas "suaves" o "severas", no es aconsejable (Harper, 2013; comunicación personal). La justificación radica en que es difícil identificar nuevos genotipos basándose en regiones aisladas del genoma, principalmente las de la mitad 3', dada la asimetría entre las mitades 5' y 3' del genoma. Como se indicó previamente, la mitad 5' del genoma de CTV es la más variable, por lo que la mayor divergencia entre grupos se ubica en esta región, más específicamente en el ORF 1a/1b (Hilf *et al.*, 1999; Albiachi-Marti *et al.*, 2000). Es así que proponen dos aproximaciones para la realización de reconstrucciones filogenéticas. Por un lado, la utilización del ORF 1a/1b por su alta divergencia entre genotipos, pero también por la presencia de regiones conservadas como los dominios funcionales (L1, L2, HEL y MET) que serían regiones ideales para la construcción de primers. Por otro lado, la otra aproximación sugerida, aunque más costosa, sería la utilización de genomas completos (Figura 1.16) (Harper, 2013).



**Figura 1.16.** Árbol filogenético de Máxima Parsimonia realizado con genomas completos de CTV. Tomado de Harper, 2013.

**1.4.9. Métodos de Diagnóstico**

Dado que los síntomas producidos por diferentes enfermedades pueden ser similares, el diagnóstico a través de la observación de los árboles puede no ser certero. Por ejemplo, la presencia de orificios en la cara cambial de la corteza del naranjo amargo por debajo de

la línea de injerto permite un diagnóstico preliminar de la infección por CTV (Ver Figura 1.3B), sin embargo, este síntoma no se observa en infecciones recientes ni en plantas propagadas sobre patrones tolerantes al decaimiento y además es similar al producido por la enfermedad conocida como *stubborn* (Tabla 1.1) (Bové & Vogel, 1981). De esta manera, la utilización de ensayos adicionales para confirmar la presencia del virus es de vital importancia.

El método tradicional de diagnóstico es el ensayo de infectividad en invernadero o testaje biológico (Roistacher & Moreno, 1991; Garnsey *et al.*, 1995), que consiste en inocular por injerto plantas de semilla de especies indicadoras sensibles a los distintos síndromes de CTV (lima Mexicana o *C. macrophylla*, naranjo dulce, naranjo amargo, pomelo), y observar, al cabo de al menos dos meses, la aparición de los síntomas correspondientes: decaimiento, enanismo, acopamiento de las hojas, clorosis nervial discontinua, SY, acorchamiento de las nerviaciones (en los aislados más virulentos) y SP (ver Figura 1.3). Este procedimiento, además de específico y sensible para el diagnóstico, permite diferenciar los aislados por su virulencia, aunque resulta lento, caro y no permite el análisis masivo de muestras, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos. Por otra parte, se han detectado aislados de tristeza que son asintomáticos incluso en las especies más sensibles (Bové *et al.*, 1988).

Otro método de diagnóstico muy utilizado es la detección serológica de CTV mediante técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos policlonales o monoclonales (Gonsalves *et al.*, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1979; Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990; Cambra *et al.*, 1991; Garnsey *et al.*, 1993; Nikolaeva *et al.*, 1998). La disponibilidad del ELISA, revolucionó los estudios epidemiológicos, de detección y caracterización de CTV (Moreno *et al.*, 2008). El anticuerpo monoclonal más utilizado para discriminar aislados es el MCA13 (Permar *et al.*, 1990), que reconoce un epítipo ampliamente conservado en los aislados agresivos y ausente en los aislados no agresivos (Pappu *et al.*, 1993). Un protocolo simplificado, denominado ELISA-IP consiste en la utilización de improntas de brotes o pecíolos de hojas en membranas de nitrocelulosa, que mantienen el antígeno inmovilizado para hacer un ensayo ELISA directo o indirecto (Garnsey *et al.*, 1993). Este procedimiento evita la preparación de extractos vegetales y permite realizar las improntas directamente en el campo, es más rápido y barato que el ELISA convencional en microplacas y tiene una sensibilidad ligeramente superior. Además, las membranas pueden ser almacenadas

durante años y ser enviadas para su procesamiento en un laboratorio lejano, por lo que es particularmente adecuado para el análisis masivo de muestras (Garnsey *et al.*, 1993).

Entre estas técnicas están el “polimorfismo conformacional de hebra simple” (*Single-strand chain polymorphism*, SSCP) (Rubio *et al.*, 1996), el “polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción” (*Restriction fragment length polymorphism*, RFLP) (Jiang *et al.*, 2008), y el “análisis de secuencia de nucleótidos” (*Nucleotide sequence analysis*) (Iglesias *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008). Cada uno de estos métodos posee sus propias ventajas y desventajas.

SSCP es un método popular entre los virólogos de plantas (García-Arenal *et al.*, 2001). Esta técnica permite diferenciar dos fragmentos de ADN del mismo tamaño que tengan hasta un nucleótido de diferencia entre ambos (Palacio *et al.*, 1999) y puede ser útil para determinar las variantes que integran una población viral (Chandler *et al.*, 1999). La metodología involucra la amplificación por PCR de una región genómica, seguido de una posterior desnaturalización de la doble hebra. Cada hebra simple adopta una única conformación de plegado que es determinada por la composición de bases del fragmento (Shi *et al.*, 1996). Pequeñas diferencias en la secuencia nucleotídica (tan pequeñas como un único nucleótido), pueden cambiar la conformación completa del amplicón y por tanto su patrón de movilidad electroforética (Rubio *et al.*, 1996). Luego ambas hebras son separadas en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante (Palacio *et al.*, 1999). Este análisis es rápido y simple, produce datos confiables y reproducibles, puede detectar diferencias de un nucleótido en fragmentos de 400 pb y se puede aplicar a estudios masivos de muestras (Rubio *et al.*, 1996; Chandler *et al.*, 1999; Kalvatchev *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2006). Una gran desventaja de este método es que para saber el número exacto de nucleótidos diferentes entre dos o más variantes, hay que realizar igualmente análisis de secuencias (Chandler *et al.*, 1999). Además, hay ocasiones en que un único cambio nucleotídico puede no producir cambios conformacionales en las moléculas y por lo tanto no ser detectado (Chandler *et al.*, 1999). Otra desventaja es que a veces las diferencias en los patrones de bandas pueden ser muy pequeñas como para discernir entre dos o más variantes (Rubio *et al.*, 1996).

El análisis de RFLP es otra herramienta molecular que puede ser utilizada para evaluar la diversidad de una población viral, así como también para discriminar entre diferentes variantes virales. La base de este análisis está en que las variantes poseen patrones

únicos de digestión por enzimas de restricción y la diferenciación de los aislados ocurre de acuerdo a la posición relativa de los sitios de restricción (Hauser *et al.*, 2000). Hauser y colaboradores (2000), lograron diferenciar entre tres especies de *Polerovirus* de la remolacha, el *Beet mild yellowing virus* (BMV), *Brassica yellows virus* (BrYV) y *Beet chlorosis virus* (BChV) mediante RFLP. Aunque el estudio mostró una diferenciación precisa y confiable entre las especies virales, es posible que el RFLP carezca de sensibilidad suficiente como para diferenciar aislados de una misma especie de virus.

Por otro lado, están los métodos moleculares que se basan en la detección específica del RNA viral, ya sea mediante hibridación molecular con sondas de cDNA y cRNA (Barbarossa y Savino, 2006; Narváez *et al.*, 2000; Rosner y Bar-Joseph, 1984) o mediante retrotranscripción y amplificación (RT-PCR) de secuencias virales (Nolasco *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1999). Algunos protocolos muy sensibles utilizan anticuerpos para “capturar” partículas del virus en el mismo tubo donde posteriormente se realiza la reacción de amplificación (IC-RT-PCR), mientras que otros evitan la preparación de extractos utilizando improntas en papel como fuente de RNA, o incrementan su sensibilidad incluyendo una segunda ronda de amplificación (nested-PCR) (Cambra *et al.*, 2002). Estos métodos son apropiados en casos particulares como la detección de ácidos nucleicos virales en áfidos.

En las últimas décadas se han desarrollado metodologías moleculares basadas en RT-PCR dirigidas a distintas regiones del genoma, para realizar el diagnóstico y la caracterización de aislados de CTV (Rubio *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008; Iglesias *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2008; Cerni *et al.*, 2009; Ruiz.Ruiz *et al.*, 2009). Sin embargo, la RT-PCR a tiempo final presenta algunas limitaciones, como ser el bajo rendimiento en muestras con bajos títulos virales y problemas de contaminación asociados a la manipulación post-amplificación.

El objetivo último del uso de las técnicas basadas en amplificación por PCR, es el análisis de secuencias nucleotídicas, ya que provee el mayor nivel de resolución para la caracterización de cepas y poblaciones de CTV. Usualmente, regiones específicas del genoma son secuenciadas y sujetas a estudios filogenéticos, debido a que por el momento la secuenciación de genomas completos es costosa, aunque con el tiempo resulta cada vez más accesible (Roy *et al.*, 2005).

Finalmente, el desarrollo de la PCR en tiempo real constituye uno de los aportes más relevantes aplicado al diagnóstico viral. Esta técnica permitió la implementación de

metodologías diagnósticas más rápidas y específicas, incluso en muestras con baja carga viral. Además, ya que no se requiere manipulación del amplicón luego de su amplificación, se eliminan los problemas de contaminación. Esta técnica permite no solo la detección de aislados de CTV, sino también su cuantificación relativa o absoluta. Esta metodología presenta dos abordajes principales, los que utilizan agentes intercalantes, como SYBR Green<sup>®</sup>, o los que utilizan sondas. Los métodos basados en sondas de hidrólisis, como las TaqMan<sup>®</sup>, son sistemas de detección específicos. Estas sondas presentan un fluoróforo unido al extremo 5' y una molécula *quencher* en el extremo 3', que absorbe la energía del fluoróforo cuando se encuentran cerca físicamente. Cuando la *Taq* polimerasa comienza a polimerizar a partir de los *primers*, hidroliza el extremo 5' de la sonda liberando el fluoróforo, incrementando la fluorescencia que es detectada por el equipo de PCR. A la fecha, varios autores han utilizado esta metodología para detectar distintas regiones del genoma de CTV, como la 3' UTR (Bertolini *et al.*, 2008), CP (Saponari *et al.*, 2008) o 5' UTR, ORF 1a y ORF 2 (Ananthakrishnan *et al.*, 2010).

#### **1.4.10. Descripción de la problemática**

En la mayoría de los países afectados por CTV, ha sido imposible realizar una cuantificación detallada de las pérdidas generadas por el virus, sin embargo el desarrollo de investigación desde la multidisciplinaria ha sido de capital importancia.

En nuestro país y en la región, CTV es endémico y está presente el vector transmisor *Toxoptera citricida*. Existen estudios realizados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA), la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República y el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, que revelan la circulación de CTV tanto a nivel de campo como en aislados. Otros estudios realizados en 1955 por Koch de Brotos y Boasso, revelan ya en aquel tiempo la clara evidencia de la circulación de CTV y el vector en nuestro país.

En Uruguay, las condiciones de control de CTV se han realizado con el uso de portainjertos resistentes o inmunes (trifolias y sus híbridos citranger Carrizo y Troyer) por lo que generalmente no se observan los decaimientos por el síntoma típico de tristeza y por lo tanto no podríamos sugerir que la severidad está en función de la rapidez del declive. Sin embargo, lo que sí se observa, son síntomas que corresponderían a la

presencia de aislados severos como lo son las acanaladuras en el tronco y ramas de pomelos y naranjos dulces, aún injertados sobre trifoliados. A eso se puede agregar lo expresado por especialistas japoneses que han visitado nuestro país y han planteado que aislados severos de CTV estarían provocando la disminución del calibre de la fruta (Ieki, 1992).

A su vez, se han descubierto en los últimos años en otras latitudes cepas de CTV que superan la resistencia de esos portainjertos (Dawson et al., 2000; Harper et al., 2010), con lo cual la dispersión de esas variantes al resto del mundo tendría resultados nefastos. Debido a éstos y otros motivos es de gran trascendencia generar capacidades e investigar la posible existencia de estas estirpes que presentan esta elevada virulencia.

Es también importante destacar que existen en el país distintas razas con diferentes grados de severidad, según las observaciones realizadas por distintos investigadores y técnicos. Se han realizado importantes estudios en el pasado como la “Caracterización de aislamientos del virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) que causan pérdidas en pomelo injertado sobre Trifolia en Uruguay” (Francis, 1997), también se han realizado desarrollos en cuanto a la detección por técnicas inmunoenzimáticas de CTV (Mamán, 1996). Sin embargo, es muy interesante resaltar que durante los últimos años la biología molecular ha tenido un enorme desarrollo que hoy en día nos permiten la detección y caracterización de CTV. Algunas de esas técnicas como la RT-PCR, secuenciación de ácidos nucleicos y los posteriores estudios filogenéticos y evolutivos, han generado conocimientos que han impactado fuertemente en la industria (Harper *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2013). En éste sentido, no existen trabajos en nuestro país que utilicen la biología molecular y el estudio de secuencias nucleotídicas de aislados de CTV. Debido a ello, es absolutamente importante desarrollar capacidades desde el punto de vista biotecnológico que permitan abordar y realizar un estudio a fondo de la problemática.

Dada la problemática planteada anteriormente, entendemos que realizar estudios moleculares en profundidad de aislados uruguayos de CTV provenientes de razas asociadas a distintos grados de severidad, es de suma importancia. Estos estudios nos permitirán establecer cuáles son las principales variantes genéticas circulantes en el país, y que similitudes o relaciones filogenéticas tienen con otras provenientes de la región u otras zonas del mundo. Por otro lado, el desarrollo de metodologías de diagnóstico y caracterización molecular, desarrolladas por primera vez en el país, serán de gran utilidad

para la detección temprana del virus y podrán ser utilizadas para complementar el saneamiento y certificación de los materiales liberados por el Plan Nacional de Saneamiento de Citrus y también por los productores en general. A su vez, se podrá caracterizar molecularmente los aislados, con el fin de acercarnos en la búsqueda de una cepa suave protectora para el desarrollo de un futuro sistema de Protección Cruzada.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Identificar y caracterizar a nivel filogenético las cepas y poblaciones circulantes de CTV en Uruguay utilizando herramientas moleculares.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Optimizar la técnica de PCR en tiempo real para la detección de CTV utilizando la región 3' UTR.
- Implementar la metodología de RT-PCR para la amplificación de los genes p23, p25 y p20 de CTV.
- Estudiar muestras de CTV con distintos grados de severidad, colectadas en distintos años y en diferentes regiones citrícolas del Uruguay.
- Analizar las secuencias mayoritarias de la población viral mediante estudios filogenéticos.
- Poner a punto un sistema de detección específica de variantes de secuencias de CTV mediante clonación y secuenciación para los genes previamente identificados.
- Analizar la estructura poblacional de CTV por medio de la clonación de los genes p20, p23 y p25.
- Establecer el grado de variabilidad genética poblacional en aislados uruguayos con respecto a la región y otras partes del mundo por medio de análisis filogenéticos.
- Realizar estudios de recombinación genética en estirpes de CTV detectadas en diferentes regiones citrícolas del Uruguay.
- Estudiar el comportamiento filodinámico de CTV.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Muestras

En el presente trabajo de tesis se utilizaron un total de 15 muestras de campo obtenidas en dos etapas (Tabla 3.1). Del total, trece fueron colectadas en quintas productoras de cítricos, ubicadas en diferentes regiones del país, entre los años 1996 y 1998, basándose en la presencia de distintos síntomas presuntivos ocasionados por CTV en los árboles observados, como falta de vigor o apariencia normal del árbol (Tabla 3.1). Posterior a la colecta, las muestras fueron injertadas en Lima mejicana (*Citrus aurantifolia*), con cuatro repeticiones por muestra, para realizar el testaje biológico, con el fin de evaluar la sintomatología de los aislamientos; y en plantas de Limón rugoso (*Citrus jambhiri*) para conservar el inóculo, siendo en ambos casos mantenidas en invernaderos libres de insectos, con temperatura y humedad controladas, en el banco de muestras del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en su sede de Salto Grande. Los síntomas foliares en Lima mejicana analizados en el testaje biológico, se categorizaron en: aclarado de nervaduras (*Vein clearing, VC*), hoja “cuchara” (*Leaf cupping, LC*) y acorchamiento de nervaduras (*Vein corking, VCk*). Al año aproximadamente, se extrajo la corteza de las plantas para evaluar la presencia e intensidad de acanaladuras en la madera (*Stem pitting, SP*) (Tabla 3.1). También se realizó el diagnóstico de las muestras mediante ELISA.

A su vez se colectaron en el departamento de Salto, en el año 2012, dos muestras de campo a partir de árboles con síntomas de CTV (Tabla 3.1). Cabe resaltar que el árbol de donde se colectó la muestra llamada MIL2012, tiene una elevada producción de naranjas y presenta aspecto vigoroso. Se incorporaron dichas muestras al estudio con el fin de comparar la variabilidad del virus en diferentes condiciones y épocas.

Como controles positivos para estandarizar las metodologías utilizadas se trabajó con dos muestras colectadas en San José y Paysandú, en los años 1993 y 2006 respectivamente, mantenidas *in planta* en el INIA, inoculadas con CTV. Plantas libres del virus fueron usadas como controles negativos.

**Tabla 3.1.** Muestras utilizadas en el presente estudio. Se detalla el nombre de la muestra, año de colecta y lugar de procedencia, variedad de donde fue colectada, resultados de test ELISA y testaje biológico, así como apariencia del árbol en campo al momento de la colecta.

Muestra	Código	Año de colecta	Procedencia	Variedad	ELISA	Testaje Bilógico	Aspecto del árbol en campo	
119	TRU7	1993	San José	Limón ( <i>Citrus limon</i> )	NR	NR		
120	FOR1	2006	Paysandú	Naranja Navel ( <i>C. sinensis</i> )	NR	NR		
121	MILCH2	1997	Salto	Pomelo Star Ruby ( <i>C. paradisi</i> )	Negativo	VC, SP suave	Sin vigor	
122	MILCH3				Positivo			
123	AD6M1	1998	San José	Limón ( <i>Citrus limon</i> )	Positivo	VC suave, Psoriasis shock, SP moderado	Altura normal	
124	AD6M2				No claro			
125	AD7M1				Negativo			SP severo
163	CCH3	1996	Salto	Pomelo Marsh Seedless ( <i>C. paradisi</i> )	Positivo	SP suave	Sin vigor	
164	AD5M1	1998	San José	Limón ( <i>Citrus limon</i> )	Positivo	VC, LC, SP severo	Sin vigor	
165	AD9M1			Naranja Valencia ( <i>C. sinensis</i> )	Positivo	VC, LC, VCK	Sin vigor	
166	MO14		Canelones	Limón ( <i>Citrus limon</i> )	Negativo	VC suave, manchas cloróticas, Psoriasis shock, SP severo	Sin vigor	
167	MO16				Positivo	VC, LC, VCK, SP moderado	Altura normal	
168	SOM1		Salto		Pomelo Star Ruby ( <i>C. paradisi</i> )	No claro	VC, LC	Chico
MIL2012	2012				Mandarina Satsuma Owari ( <i>C. reticulata</i> )	NR	NR	Árbol destacado por tamaño y producción de fruta
CAP2012							NR	

### 3.2. Extracción de ARN

Con el fin de obtener un alto rendimiento en la extracción del ARN viral para la puesta a punto de la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa subsiguientes, se evaluaron tres métodos de extracción diferentes, mediante el reactivo TRIzol® (Invitrogen™, Life Technologies) y mediante los kits comerciales “*Isolate Plant RNA Mini Kit*” (Bioline) y “*RNeasy Plant Mini Kit*” (QIAGEN). En todos los casos se partió de 0,1 g de tejido vegetal (hojas y tallos) triturado y congelado a -160°C durante 2 horas. Estos ensayos se realizaron con tres de las muestras disponibles (119, 120 y 121). El resto de las muestras fueron extraídas con el kit de QIAGEN.

3.2.1. Para la extracción con el método de TRIzol® se realizó un homogeneizado de la muestra agregando 1 ml del reactivo TRIzol® a cada tubo y se procedió de la siguiente manera:

- Mezclar con vortex e incubar 10 min a TA
- Agregar 200 µl de cloroformo, vortexear 15 seg e incubar 3 min a TA. Centrifugar 15 min a 12.000 x g.

- Transferir la parte acuosa a un nuevo tubo y precipitar el ARN con igual volumen de isopropanol.
- Vortexear e incubar 10 min a -20°C.
- Centrifugar 20 min a 12.000g.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el ARN con 1 ml de etanol 70%.
- Vortexear y centrifugar 5 min a 7.500g.
- Secar el ARN y resuspenderlo en 50 µl de agua libre de RNasas precalentada a 65°C.

3.2.2. Las extracciones con los kits comerciales “*Isolate Plant RNA Mini Kit*” de Biotline y “*RNeasy Plant Mini Kit*” de QIAGEN se realizaron según las instrucciones brindadas por los fabricantes. El ARN obtenido fue resuspendido en 50 µl de agua libre de RNasas.

### 3.3. Obtención del ADN copia

El ADN complementario (cDNA) se sintetizó mediante retrotranscripción del ARN viral utilizando la enzima “*SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT)*” ((Invitrogen™, Life Technologies) según el siguiente protocolo para un volumen final de 20 µl:

- Colocar en un tubo de 200 µl, 1 ng- 5 µg de ARN total, 50- 250 ng de *primers* randómicos o 2 pmol de *primer* específico reverso, 1 µl de dNTPs 10 mM cada uno y agua destilada estéril c.s.p. 13 µl.
- Calentar la mezcla a 95°C por 5 min y transferir rápidamente a hielo por 5 min.
- Agregar 4 µl de *buffer 5X First-Strand* y 2 µl de DTT 0.1 M. Mezclar.
- Incubar por 2 min a 42°C (*primer* específico) o a 25°C (*primers* randómicos).
- Agregar 1 µl (200 U) de SuperScript™ II RT y mezclar con pipeta.
- Si se usan *primers* randómicos realizar una incubación adicional de 10 min a 25°C.
- Incubar toda la mezcla a 42°C durante 50 min.
- Inactivar la reacción a 70°C por 15 min.

Para la puesta a punto de las metodologías utilizadas y para evaluar la eficiencia de las distintas reacciones, se sintetizó el cDNA utilizando el *primer reverso*, específico para cada gen a amplificar (Tabla 3.2) y/o *primers* randómicos hexaméricos ((Invitrogen™, Life Technologies) capaces de amplificar fragmentos al azar de todo el genoma de CTV.

### 3.4. PCR en Tiempo Real

La detección de los genomas de CTV se realizó mediante la amplificación de un fragmento de 101 pb ubicado en la región 3' UTR del genoma. Los *primers* utilizados, 3' UTR1 y 3' UTR2 y la sonda TaqMan 181T, fueron tomados de Bertolini y colaboradores, 2008 (Tabla 3.2). La sonda TaqMan 181T presenta en su extremo 5' a la molécula 6-carboxifluoresceína (FAM) como fluoróforo y a la tetrametilrodamina (TAMRA) como *quencher* en su extremo 3'.

Se realizó la amplificación de cada muestra por duplicado y cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µl de acuerdo a las siguientes condiciones:

Reactivo	Concentración stock	Volumen
Sensi Mix™ II Probe kit (Bioline)	2X	12,5 µl
Primer forward 3'UTR1	10 µM	2,5 µl
Primer reverse 3'UTR2	10 µM	2,5 µl
Sonda 181T (FAM-TAMRA)	10 µM	0,5 µl
Agua libre de nucleasas		2,0 µl
cDNA		5,0 µl

Las condiciones del ciclado se detallan en la tabla 3.3.

El análisis se llevó a cabo en un equipo Rotor-Gene Q (QIAGEN) y la adquisición de los datos y el análisis posterior se realizó con el paquete de *software REST* incluido en el equipo.

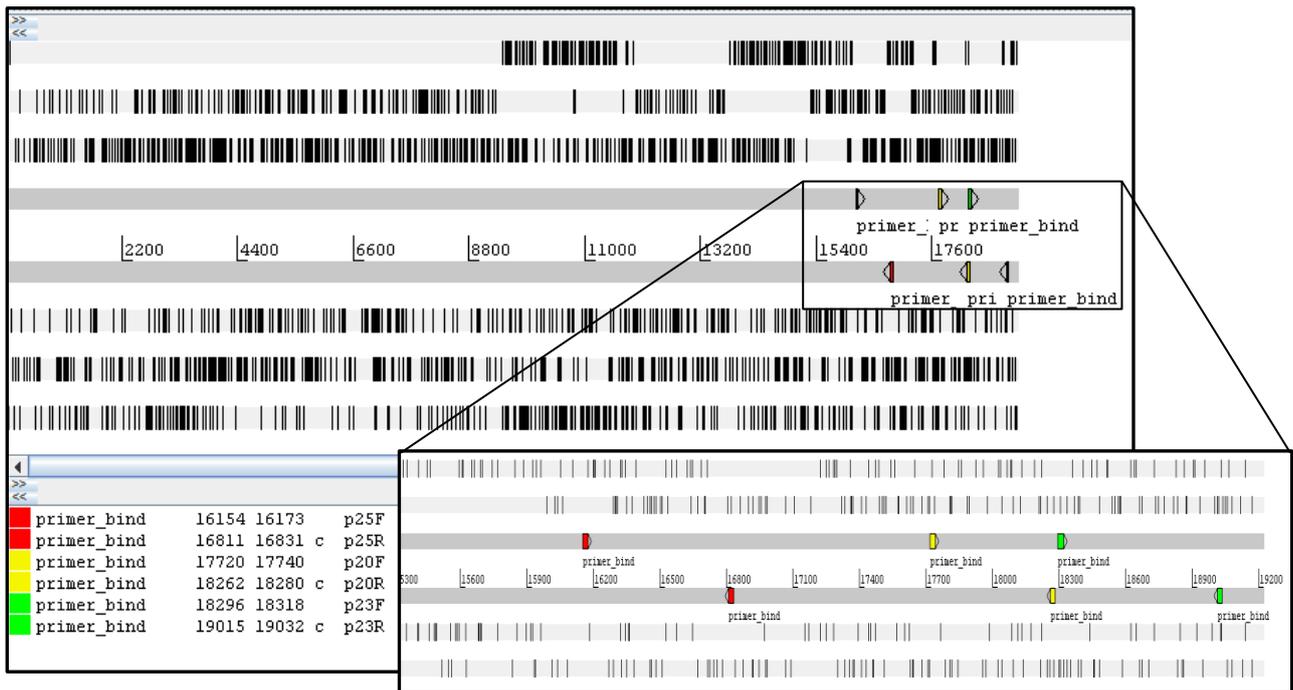
**Tabla 3.2:** *Primers* utilizados para la retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo final y tiempo real de los fragmentos correspondientes a los genes p25, p23 y p20 y a la región 3'UTR. Se detalla la secuencia, longitud del amplicón, sitios de hibridación en el genoma (según aislado VT (U56902) y referencia.

<i>Primer</i>	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Longitud del Amplicón	Posición en el genoma	Referencia
3' UTR1	CGTATCCTCTCGTTGGTCTAAGC		19116-19138	
3' UTR2	ACAACACACACTCTAAGGAGAACTTCTT	101 pb	19190- 19217	Bertolini et al., 2008
181T	FAM-TGGTTCACGCATACGTTAAGCCTCACTTG-TAMRA		19161- 19189	
p25F	TGAATTATGGACGACGAAAC	677 pb	16154- 16173	Iglesias et al., 2008
p25R	TCAACGTGTGTTGAATTTCCC		16811- 16831	
p20F	ACAATATGCGAGCTTACTTTA	557 pb	17720- 17740	Rubio et al., 2001
p20R	AACCTACACGCAAGATGGA		18262- 18280	
p23F	GTCTCTCCATCTTGCGGTGTAG	736 pb	18296- 18318	Iglesias et al., 2008
p23R	CAATCAGATGAAGTGGTG		19015- 19032	

### 3.5. PCR en Tiempo Final

La amplificación de los distintos fragmentos correspondientes a los genes p20, p23 y p25 se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La reacción fue catalizada por la “*Taq DNA Polymerase, recombinant*” (Invitrogen™, LifeTechnologies) y se utilizó un termociclador Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems).

Los *primers* utilizados para amplificar los genes p20, p23 y p25 se detallan en la tabla 3.2 y el sitio de hibridación de los mismos en el genoma de CTV se observa en la figura 3.1.



**Figura 3.1.** Esquema realizado con el programa Artemis (Rutherford *et al.*, 2000) donde se muestra la longitud del genoma de CTV (barras grises) y las posiciones donde hibridan los *primers* usados en la RT y PCR. Los cebadores que amplifican el fragmento de p25 se muestran en rojo, los correspondientes a p20 en amarillo y en verde los que amplifican parte de p23. Los cebadores reversos son los utilizados para la síntesis del cDNA. El recuadro muestra un acercamiento de la región 3' del genoma donde hibridan los *primers*.

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l utilizando los reactivos en las siguientes concentraciones finales:

Reactivo	[ ] stock	Volumen ( $\mu$ l)
10X PCR Buffer minus Mg	10x	2.5
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	0.8
Primer Directo	10 $\mu$ M	1.0
Primer Reverso	10 $\mu$ M	1.0
Taq DNA Polymerase	5 U/ $\mu$ l	0.3
cDNA		2.5
Agua		c.s.p 25

Las condiciones del ciclado fueron similares para los 3 genes, con variaciones en la temperatura de *annealing* o cantidad de ciclos para cada reacción. Las mismas se detallan en la tabla 3.3. Como controles positivos se utilizaron las muestras 119 y 120,

descritas previamente. En todos los casos se incorporó un control negativo de reactivos.

**Tabla 3.3.** Condiciones de ciclado de PCR en tiempo real para la región 3'UTR y de las PCR en tiempo final para p20, p23 y p25.

Proceso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
3'UTR			
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	
Desnaturalización	95°C	15 seg	45
Hibridación- Extensión	60°C	1 min	
p25			
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	30 seg	35
Hibridación	50°C	30 seg	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	5 min	
p20			
Desnaturalización inicial	94°C	3 min	
Desnaturalización	94°C	30 seg	35
Hibridación	50°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	4 min	
p23			
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	
Desnaturalización	95°C	30 seg	40
Hibridación	54°C	30 seg	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	15 min	

### 3.6. Electroforesis

Los amplicones obtenidos fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% teñidos con el colorante GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltd) y visualizados mediante luz ultravioleta (UV) en un transiluminador. La corrida se realizó durante 1 hora a 120 voltios constantes, en *buffer* TAE 1X.

El registro de los resultados se realizó mediante un procesador de imágenes.

### 3.7. Purificación de productos de PCR

Todos los fragmentos amplificados fueron purificados con el kit “*AxyPrep DNA Gel Extraction*” (Axygen), según recomendaciones del fabricante. La concentración del DNA purificado se midió con un espectrofotómetro (Unicom 2400PC).

La correcta purificación de los productos fue visualizada en geles de agarosa en las condiciones detalladas anteriormente.

### 3.8. Clonación de fragmentos génicos

Se clonaron los amplicones obtenidos de los genes p20, p23 y p25 utilizando el kit “*CloneJET™ PCR Cloning*” (Thermo Scientific Inc., Hanover, MD) y bacterias *E. coli NEB5-α* competentes (New England BioLabs).

De acuerdo a las propiedades del vector de clonación presente en este kit (Figura 3.2), solamente pueden ser clonados productos con extremos romos, dado que el vector posee un sitio de inserción para productos de este tipo en el sitio de policlonado. Los productos de PCR amplificados con la enzima *Taq DNA Polimerasa* presentan en su extremo 3' una región de poli-A, por lo que deben ser sometidos a una reacción de *blunting* para transformar sus extremos, previo a ser clonados.

Para las reacciones de *blunting*, ligación y transformación se siguieron las indicaciones de los fabricantes con pequeñas modificaciones, según se detalla a continuación:

#### Reacción de *blunting*

- Colocar en un tubo eppendorf de 0,2 ml los siguientes reactivos:
  - ✓ 10 µl de buffer de reacción 2X
  - ✓ hasta 7 µl de producto de PCR purificado
  - ✓ Agua libre de nucleasas c. s. p 18 µl
  - ✓ 1 µl de DNA *blunting enzyme*
- Vortexear y centrifugar 3- 5 segundos.
- Incubar 5 min a 70°C. Colocar en hielo.

#### Reacción de ligación

- Agregar los siguientes reactivos a la mezcla de *blunting*:
  - ✓ 1 µl del vector pJET 1.2/blunt (50 ng/µl)

- ✓ 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/µl)
- Vortexear y centrifugar 3-5 seg.
- Incubar la mezcla de ligación a temperatura ambiente durante 5 minutos.

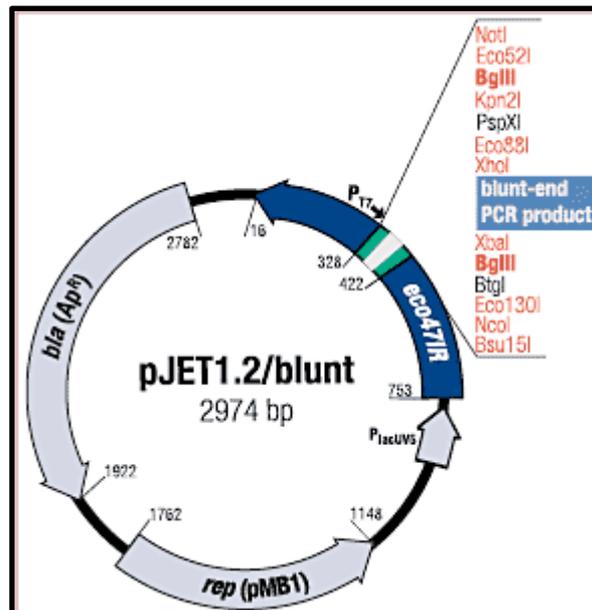
### **Reacción de transformación**

- Descongelar en hielo durante 10 minutos un tubo de células competentes *E. coli NEB 5-α*.
- Transferir 50 µl de las células a un tubo de 0,2 ml por cada ligación.
- Agregar entre 1-5 µl de reacción de ligación (1 pg- 100 ng) a la mezcla de células. Mezclar cuidadosamente 4-5 veces el tubo para mezclar las células y el DNA.
- Colocar la mezcla en hielo durante 30 minutos.
- Realizar un *shock* térmico a 42°C exactamente durante 30 segundos.
- Colocar rápidamente el tubo en hielo durante 5 minutos.
- Pipetear 300 µl de LB sin ampicilina a temperatura ambiente en un tubo tipo falcon de 15 ml. Agregar las células transformadas.
- Incubar en shaker a 37°C por 60 minutos, agitando vigorosamente (250 rpm).
- Precalentar las placas con LB agar y ampicilina a 37°C (2 placas por muestra).
- Plaquear 150 µl en cada una de las placas.
- Incubar las placas *overnight* a 37°C.

En todas las etapas se tuvo la precaución de trabajar en hielo y en condiciones de esterilidad.

Para la selección de las bacterias transformantes, se utilizaron las siguientes características del vector. Este presenta el gen *bla* codificante de la β-lactamasa, el cual le confiere resistencia al antibiótico ampicilina. Por otro lado, presenta el gen modificado *Eco47IR*, que codifica para la enzima de restricción *Eco47I*, producto letal para la bacteria en la cual se expresa (Figura 2.2). Dentro de este gen se encuentra el sitio de policlonado, característica utilizada para la selección positiva ya que al albergar un inserto, *Eco47IR* es interrumpido y su producto no es funcional. De esta manera, las bacterias que no adquirieron el vector no pueden crecer en un medio con ampicilina, y las transformadas con el vector sin inserto, tampoco pueden desarrollarse debido a la expresión de *Eco47IR*. Por lo tanto, solamente las bacterias con un plásmido recombinante crecen en un medio con ampicilina.

Las colonias obtenidas fueron crecidas en medio LB con ampicilina durante toda la noche en agitador a 37°C para realizar posteriormente la extracción de los plásmidos.



**Figura 3.2.** Mapa del vector de clonación pJET1.2/blunt utilizado en el presente trabajo.

### 3.9. Extracción del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico se realizó en distintas etapas, analizando 10 colonias por muestra cada vez. Luego se confirmó la positividad de las mismas mediante PCR con los *primers* del vector pJET y usando como molde diluciones (1:100) de las minipreparaciones realizadas. Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta obtener un mínimo de 10 clones positivos por muestra.

El protocolo utilizado fue modificado a partir del protocolo del kit comercial de extracción “QIAprep Spin Miniprep” (Qiagen, Hilden, Alemania) y se detalla a continuación:

- Centrifugar 3 ml de cultivo de bacterias crecido 16 horas en LB-amp y resuspender en 0.3 ml de Buffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNasa).
- Agregar 0.3 ml de Buffer 2 (200 mM NaOH; 1% SDS), mezclar invirtiendo el tubo 4 o 5 veces e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 0.3 ml de Buffer 3 (3.0 M Acetato de Potasio, pH 5.5) y mezclar por inversión 4 o 5 veces. Incubar 5 minutos en hielo.
- Centrifugar a 13800 xg durante 12 minutos y recuperar el sobrenadante.

- Precipitar el ADN con 0.7 volúmenes de isopropanol y centrifugar a 13800 xg durante 20 minutos.
- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol 70% centrifugando 5 minutos a 13800 xg.
- Descartar el etanol 70% y secar el pellet en estufa a 37°C.
- Resuspender el pellet en 30 µl de agua libre de nucleasas e incubar a 65°C durante 10 minutos.

El DNA extraído fue visualizado en geles de agarosa al 2 %, teñidos con el colorante GoodView™ (SBS Genetech Co., Ltd) en las mismas condiciones que se detallaron en la sección 3.6. La concentración del mismo se midió por comparación de intensidad de las bandas con el marcador de peso molecular que se utilizó en cada caso.

Posterior a la extracción del DNA plasmídico se confirmó la presencia del inserto por PCR. Para esto, como se aclaró previamente, se realizaron diluciones 1:100 de las *minipreps* y se utilizaron los *primers* del vector. La enzima utilizada fue la *Taq DNA Polymerase (recombinant)* (Thermo Scientific). Las condiciones de la reacción fueron las siguientes:

Reactivo	[] stock	Volumen (µl)
10X PCR Buffer minus Mg	10x	1.5
Mezcla de dNTP's	10 mM	0.3
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	0.9
Primer pJET 2.1F	10 µM	0.6
Primer pJET 2.1R	10 µM	0.6
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	1.0
Molde		1.0
Agua		c.s.p 15

Las condiciones del ciclado fueron las especificadas por los fabricantes del “CloneJET™ PCR Cloning Kit”.

### **3.10. Secuenciación de los amplicones obtenidos por PCR en tiempo final y por clonación**

Se realizó la secuenciación automática en ambos sentidos de los productos de PCR purificados de todas las muestras analizadas correspondientes a los genes p20, p23 y p25, previo a su clonación; y en una etapa posterior se secuenciaron 10 clones de cada muestra para los 3 genes analizados en el presente estudio. En el primer caso se utilizaron los *primers* específicos para cada gen, que fueron los mismos que se utilizaron para su amplificación. En el caso de los clones, estos se secuenciaron utilizando los *primers forward* y *reverse* del vector pJET, utilizados para la clonación.

La secuenciación se realizó de forma automática en el equipo ABI3130 (Applied Biosystems) en la Unidad de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo.

### **3.11. Edición y alineamiento de secuencias**

Las secuencias obtenidas de los genes p20, p23 y p25 fueron ensambladas y editadas con el programa SeqMan (Lasergene, DNASTAR) al igual que las secuencias de los clones correspondientes a los fragmentos de los tres genes analizados para todas las muestras.

Los alineamientos de las secuencias se realizaron con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6.0 (MEGA 6.0) (Tamura *et al.*, 2013) a través del método Clustal W. Estas secuencias se compararon con secuencias de referencia de CTV, provenientes de distintas partes del mundo, obtenidas de la base de datos del GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (Tabla 3.4). También se incluyeron en los alineamientos, secuencias de Brasil y Argentina publicadas en el 2005, 2008 y 2009 (Iglesias *et al.*, 2005, 2008; Martin *et al.*, 2009), con el fin de una comparación a nivel regional (Números de acceso GenBank: Argentinas: p25 AY750755 al AY750785; p23 AY750732 al AY750754, AY962388 al AY962348; p20 AY962326 al AY962335; Brasil p20: FM955991 y FM955993).

### **3.12. Análisis filogenéticos**

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 6.0 utilizando dos metodologías diferentes.

Con el objetivo de corroborar la clasificación realizada por Harper (2013), se realizó el análisis de los genomas completos que se utilizaron en dicha publicación (Tabla 3.4),

empleando la metodología de Máxima Parsimonia (MP) utilizada por el autor. A su vez, se realizó el mismo análisis empleando el método de Neighbor Joining (NJ) con el modelo Kimura 2 Parámetros (K2P) y 1000 seudoréplicas para obtener apoyo estadístico.

**Tabla 3.4.** Secuencias de referencia obtenidas del GenBank utilizadas en el presente trabajo. Se muestra nombre del aislado, país de procedencia, número de acceso en GenBank, características de la secuencia y genotipo al que pertenecen según Harper y colaboradores, 2013 (\*).

Aislamiento	Nº Acceso GenBank	País	Secuencia	Genotipo (*)
B165	EU076703	India	Genoma completo	T68
FL202	KC517493	EEUU	Genoma completo	VT
FS674	KC517485	EEUU	Genoma completo	T36
FS701	KC517494	EEUU	Genoma completo	VT
	KC517489	EEUU	Genoma completo	T30
	KC517486	EEUU	Genoma completo	T36
FS703	KC517492	EEUU	Genoma completo	VT
	KC517491	EEUU	Genoma completo	T30
	KC517487	EEUU	Genoma completo	T36
FL278	KC517490	EEUU	Genoma completo	T30
FS577	KC517488	EEUU	Genoma completo	T36
FS02-2	EU937519	EEUU	Genoma completo	VT
	EU937520	EEUU	Genoma completo	T30
	EU937521	EEUU	Genoma completo	T36
CT11A	JQ911664	China	Genoma completo	VT
AT-1	JQ061137	China	Genoma completo	VT
CT14A	JQ911663	China	Genoma completo	T68
T36 (clon)	AY170468	EEUU	Genoma completo	T36
NuagA	AB046398	Japón	Genoma completo	VT
NZ-B18	FJ525436	Nueva Zelanda	Genoma completo	T68
NZ-M16	EU857538	Nueva Zelanda	Genoma completo	T3
NZRB-G90	FJ525432	Nueva Zelanda	Genoma completo	RB
NZRB-M12	FJ525431	Nueva Zelanda	Genoma completo	RB
NZRB-M17	FJ525435	Nueva Zelanda	Genoma completo	RB
NZRB-TH28	FJ525433	Nueva Zelanda	Genoma completo	RB
NZRB-TH30	FJ525434	Nueva Zelanda	Genoma completo	RB
B301	JF957196	Puerto Rico	Genoma completo	RB
T3	KC525952	EEUU	Genoma completo	T3
T30	AF260651	EEUU	Genoma completo	T30
T36	U16304	EEUU	Genoma completo	T36
T68-1	JQ965169	EEUU	Genoma completo	T68
T318A	DQ151548	España	Genoma completo	VT
T385	Y18420	España	Genoma completo	T30
VT	U56902	Israel	Genoma completo	VT

### 3.13. Estudios de recombinación

Para estudiar la presencia de aislados recombinantes se utilizaron los programas bioinformáticos SimPlot y Bootscan del paquete SimPlot (Lole *et al.*, 1999) y los algoritmos GARD y SPR del sitio web DataMonkey ([www.datamonkey.org](http://www.datamonkey.org)).

### 3.14. Análisis de coalescencia

Para realizar el análisis de coalescencia se utilizaron secuencias datadas y obtenidas en distintos puntos en el tiempo en Uruguay (Tabla 3.1).

Se estimó la edad del ancestro común más reciente (tMRCA) y la tasa de sustitución (sustituciones/sitio/año) de las variantes virales circulantes en la región, utilizando las secuencias nucleotídicas del clado sudamericano, SA. Previo al análisis se corroboró la monofilia del clado mediante la realización de árboles por Máxima Verosimilitud utilizando el servidor <http://www.phylogeny.fr> (Figura 5A Anexo). La significancia de los nodos de los árboles se obtuvo mediante el método de bootstrap con 1000 pseudoréplicas. Se utilizó la tasa de evolución descrita por Silva y colaboradores en el 2012, para el gen p25, que es  $1.58 \times 10^{-4}$  nt/sitio/año con un rango de variación entre  $1.73 \times 10^{-5}$  y  $3.16 \times 10^{-4}$  nt/sitio/año con un 95% de confianza. Las estimaciones de estos parámetros evolutivos fueron calculadas con el paquete de programas BEAUTi/BEAST (Drummond *et al.*, 2007).

El programa BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees*) analiza secuencias de ADN utilizando aproximaciones bayesianas a través de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para nuestros datos se utilizó un largo de cadena de 50.000.000, con un reloj molecular relajado y una tasa de evolución de  $1.58 \times 10^{-4}$  nt/sitio/año (Silva *et al.*, 2012). Para asegurarse que la MCMC había llegado a la convergencia, se corroboró que todos los parámetros tuvieran valores de ESS (*Effective Sample Size*) mayores a 200.

La incertidumbre de los parámetros, tMRCA y tasa de sustitución en nuestro conjunto de datos, fue calculada a través de valores del intervalo de confianza del 95% (HPD 95%).

Los resultados fueron analizados de forma gráfica con el programa TRACER (Drummond *et al.*, 2007).

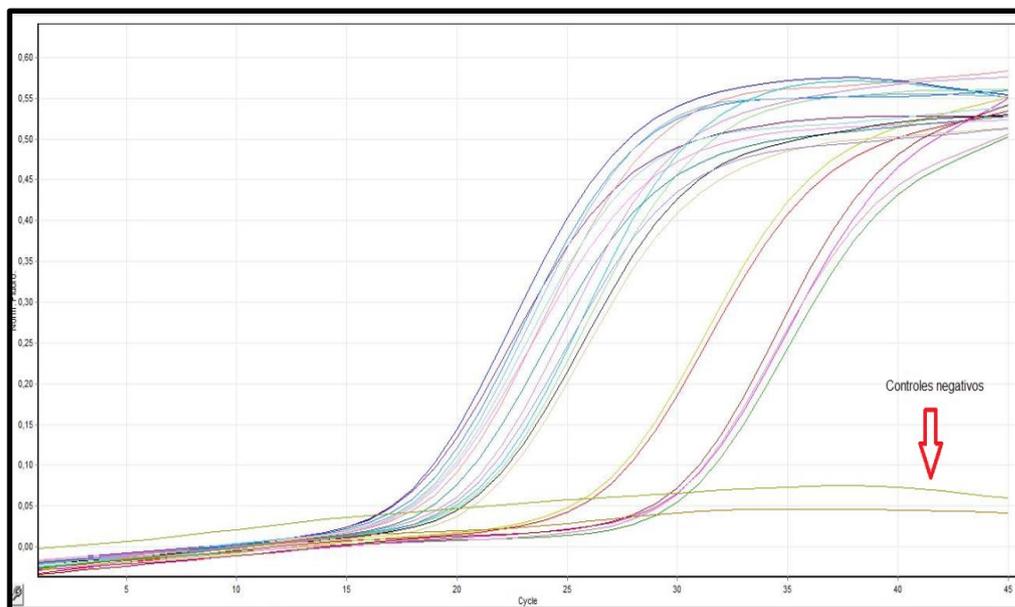
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Comparación de metodologías de extracción de ARN

Con el fin de obtener cantidades considerables de ARN para su posterior procesamiento se compararon 3 métodos de extracción diferentes utilizando las muestras 119, 120 y 121. Posteriormente a su amplificación por RT-PCR, no se observaron diferencias importantes entre los tres métodos en cuanto a rendimiento, por lo que se decidió seguir trabajando con el “*RNeasy Plant Mini Kit*” de *QIAGEN* debido a la rapidez de la metodología.

### 4.2. Detección de CTV por PCR en tiempo real

La detección de los genomas de CTV se estandarizó utilizando las muestras del banco de INIA, previamente analizadas por ELISA. Ambas réplicas, de todas las plantas analizadas fueron positivas, aunque se observó su amplificación inicial en distintos ciclos de la corrida (Figura 4.1), pudiendo asumir la presencia de distinta carga viral entre las diferentes muestras. Las muestras que presentaron la carga viral más baja fueron la 163 y 168, que mostraron un ciclo umbral alrededor del ciclo 32. En ninguna de las dos réplicas de los controles negativos se obtuvo amplificación (Figura 4.1).

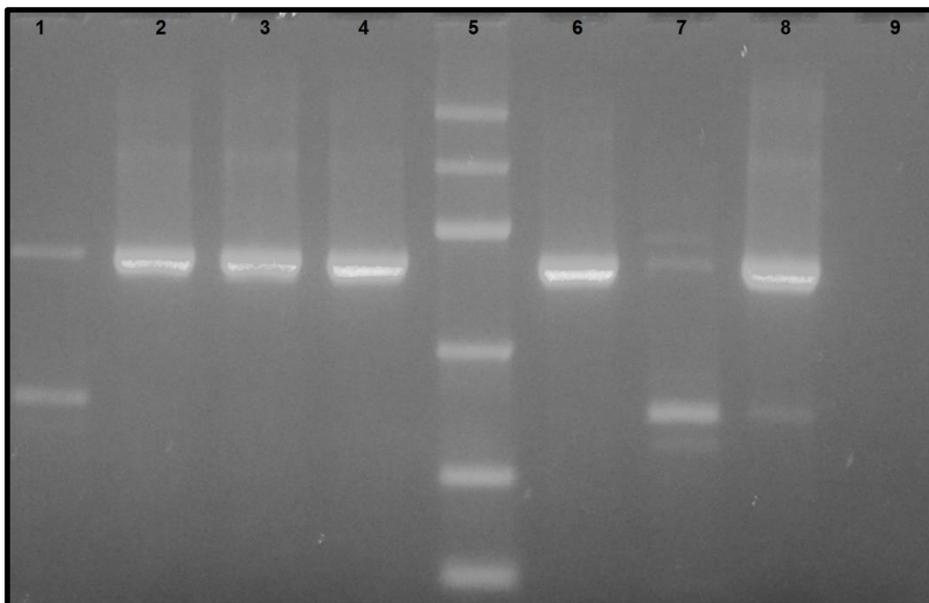


**Figura 4.1.** Gráfico de Fluorescencia vs. N° de ciclos. Se observa la amplificación de los genomas de CTV por PCR en tiempo real.

### 4.3. Detección de CTV por PCR en tiempo final

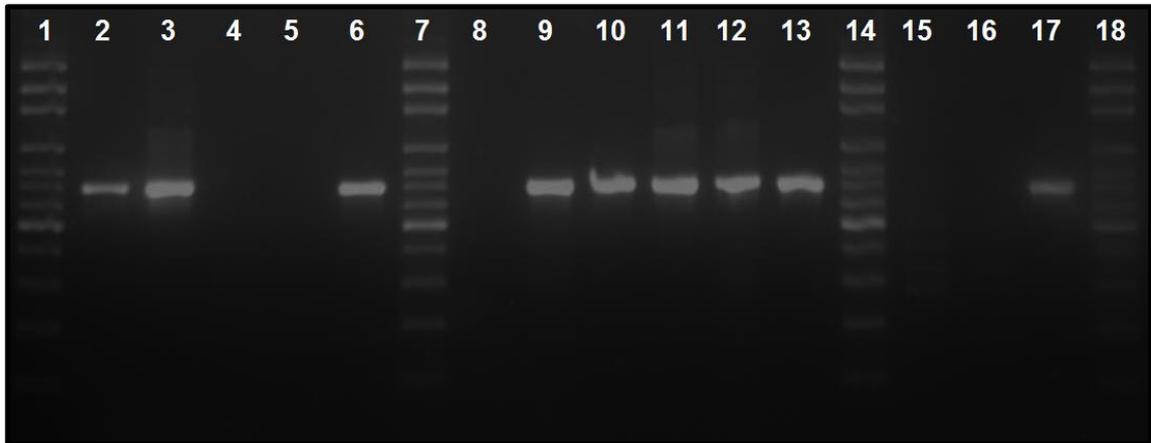
Los productos obtenidos de los tres fragmentos analizados, confirmaron la efectividad de las extracciones y el diseño de las reacciones de RT-PCR. En todos los casos se observaron los amplicones correspondientes a los genes de interés.

Para el caso del gen p25, el amplicón esperado presentó un tamaño de 650 pb (Figura 4.2). Todas las muestras en estudio se lograron amplificar correctamente para esta región del genoma de CTV excepto las muestras 163, 168 y CAP2. Los productos obtenidos para dichas muestras, como se observa en la figura 4.2, presentaban amplificaciones inespecíficas.



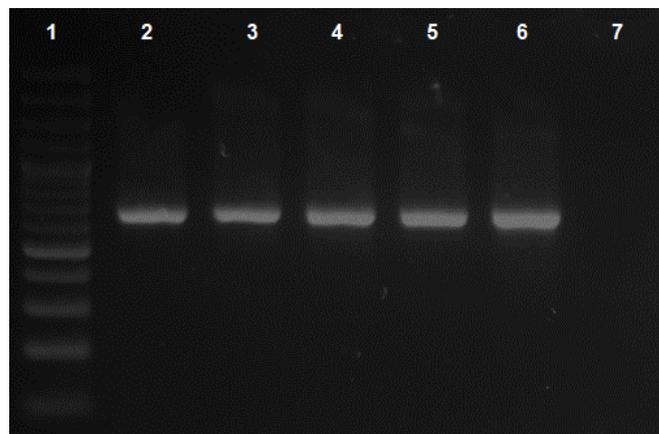
**Figura 4.2.** Gel de agarosa con productos amplificados del gen p25. Carril 1: M163; Carril 2: M164; Carril 3: M165; Carril 4: M166; Carril 5: PM; Carril 6: M167; Carril 7: M168; Carril 8: Control positivo M119; Carril 9: Control negativo.

Para la región de p23, todas las muestras excepto la 163 y CAP2, fueron amplificadas correctamente. El producto esperado en este caso era de 723 pb (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Gel de agarosa con productos amplificados del gen p23. Carril 1: PM 2: M119; Carril 3: M120; Carril 4: M121; Carril 5: M122; Carril 6: M123; Carril 7: HLI; Carril 8: M163; Carril 9: M124; Carril 10: M125; Carril 11: M164; Carril 12: M165; Carril 13: M167; Carril 14: PM; Carril 15: M168; Carril 16: Control negativo; Carril 17: Control positivo M166; Carril 18: PM.

Por último, el fragmento correspondiente al gen p20, de 557 pb, fue obtenido para todas las muestras analizadas en el presente estudio, excepto para la 121 y 168 (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Gel de agarosa con productos amplificados del gen p23. Carril 1: PM; Carril 2: M119; Carril 3: M120; Carril 4: M122; Carril 5: M123; Carril 6: Control positivo M166; Carril 7: Control negativo.

Varias modificaciones en los protocolos de las distintas etapas de procesamiento de las muestras, que no se lograron amplificar por esta metodología, se realizaron a lo largo del desarrollo de esta tesis, como ser aumento de la concentración de ARN para hacer el cDNA, el uso de DMSO, gradientes de temperatura, variación de la concentración de reactivos en la PCR (datos no mostrados).

En cuanto al aislado CAP2, solamente se logró amplificar para el gen p20. Sin embargo, a pesar de que se intentó secuenciar el producto dos veces, la secuencia de DNA obtenida fue de muy mala calidad, por lo que se decidió descartar su uso en la presente tesis.

#### 4.4. Composición de las poblaciones virales

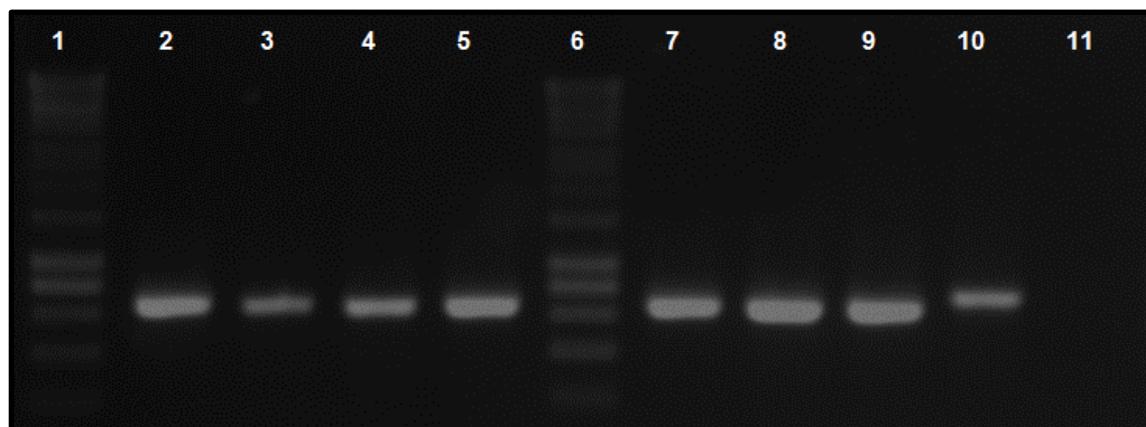
Con el fin de identificar las variantes de secuencias que componen las poblaciones virales analizadas, se analizaron los clones obtenidos de cada aislado. En la tabla 4.1 se detalla el número de clones obtenidos por muestra y por gen. No todas las secuencias amplificadas se lograron clonar y no todas las muestras que si se clonaron mostraron la misma eficiencia, como se puede observar en la muestra 121 para la región p25 donde solo se pudieron obtener tres clones. Los fragmentos correspondientes al gen p25 de las muestras 125 y MIL2012 y los correspondientes al gen p23 de las muestras 163 y CAP2, no se pudieron clonar, a pesar de realizar más de un intento, incluyendo productos de PCR purificados nuevos y ligaciones nuevas.

**Tabla 4.1.** Número de clones obtenidos por muestra para cada uno de los genes analizados. Se indica el total de clones secuenciados por gen y el total absoluto (recuadro rojo). N/C: No Clonado.

Muestra	p25	p20	p23	
119	12	9	11	
120	10	9	13	
121	3	10	N/C	
122	9	12	12	
123	12	10	10	
124	11	11	12	
125	N/C	14	9	
163	N/C	N/C	N/C	
164	8	12	11	
165	8	13	9	
166	10	10	10	
167	11	11	10	
168	N/C	12	N/C	
MIL2012	N/C	12	9	
<b>Total</b>	94	145	116	<b>355</b>

El análisis de los productos obtenidos de la clonación se realizó mediante la preparación de *minipreps* a todas las colonias obtenidas y posterior verificación del inserto esperado por rastreo por PCR utilizando los *primers* del vector de clonación pJET. Como

se observa en la figura 4.5, existió un buen rendimiento en las extracciones de DNA plasmídico.



**Figura 4.5.** Gel de agarosa donde se observa la amplificación por PCR de *minipreps* de 7 clones de la muestra 164 para la región de 723 pb del gen p23. Carril 10: control positivo (fragmento de gen vp2 de IBDV clonado en pJET, 770 pb); Carril 11: control negativo.

#### 4.5. Análisis de genomas completos

Se realizó un cladograma mediante el método de MP, con 34 genomas completos (Tabla 3.4) obtenidos de la base de datos del NCBI, como fue realizado por Harper (2013). Con el fin de comparar si las topologías de los árboles se mantenían se realizó el mismo análisis mediante el método de NJ y se observó en ambos casos la distribución en los 6 genotipos descritos previamente por el autor (Harper, 2013) (Figura 1.16; Figura 1 Anexo). El método de NJ se ha utilizado ampliamente por varios autores, por lo que se decidió seguir trabajando con el mismo (Jiang et al., 2008; Herrera-Isidró et al., 2009; Melzer et al., 2010; Ayazpour et al., 2011; Matos et al., 2013; Scott et al., 2013).

También se realizó el análisis de los genomas completos utilizando solamente las regiones de los genes p20, p23 y p25, con los métodos de MP y NJ, y se observó que en todos los casos se mantenía la topología de los árboles respetando la distribución en los seis genotipos descritos (datos no mostrados).

#### 4.6. Caracterización de aislados de CTV mediante el análisis de secuencias mayoritarias

Se realizó el estudio de las secuencias mayoritarias obtenidas en este trabajo, junto con las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos (Tabla 3.4), para cada uno de los genes analizados. En todos los casos se compararon los métodos de NJ y MP.

Para la región de p25 se analizó un total de 45 secuencias con una longitud de 636 pb, siendo 11 de ellas aislados uruguayos obtenidos en este estudio. El árbol mostró 6 clados bien definidos, con alto soporte estadístico (Figura 2 Anexo). Las secuencias del genotipo T36 agruparon con un soporte del 100%, al igual que las del genotipo T30. El clado del genotipo RB tuvo un bootstrap de 99%. Ninguna de las secuencias uruguayas agrupó en ninguno de estos genotipos. La muestra 167, procedente de Canelones, agrupó con la secuencia de referencia del genotipo T3 con un soporte estadístico del 100%. El clado formado por secuencias del genotipo VT tuvo un apoyo del 96% e incluyó las muestras uruguayas 119, 123, 124, 125 y 164. Por último, se observó un clado formado solamente por los aislados uruguayos 120, 121, 122, 165 y 166 con un valor de bootstrap de 97%.

En el caso del gen p20, se trabajó con un fragmento de 520 pb y un total de 47 secuencias, de las cuales 13 fueron de Uruguay. Se observaron 6 grupos bien definidos (Figura 3 Anexo). Dos grupos, con un apoyo del 100% cada uno, fueron formados por aislados de los genotipos RB y T30, y nuevamente ninguna de las muestras uruguayas agruparon con estos genotipos. La muestra 164, obtenida en San José, agrupó con los aislados del genotipo T36 con un apoyo estadístico del 98%. Por otro lado, la muestra uruguaya 166 no agrupó con ninguna secuencia de referencia ni con ninguna otra muestra uruguaya. También se observó, con un apoyo del 96%, un *cluster* formado por la muestra de referencia T3 y las muestras uruguayas 120, 121, 165, 167, 168 y MIL2012. Por último, el clado que involucra las muestras del genotipo VT, se conformó por aislados de referencia y por muestras uruguayas. Un subgrupo dentro del clado, que mostró un valor de *bootstrap* de 99%, contiene las secuencias uruguayas 119, 123, 124 y 125 y la secuencia de referencia NZ-M16. La muestra 122, obtenida en Salto, agrupó con las cepas de referencia de China, Japón y España, correspondientes al genotipo VT asiático.

El árbol filogenético para el gen p23, fue realizado con un total de 46 secuencias de 623 pb, de las cuales 12 fueron uruguayas (Figura 4 Anexo). La topología del árbol fue similar a la obtenida para los genes p20 y p25, manteniéndose la distribución en 6 grupos.

Nuevamente, los genotipos RB y T30 formaron dos clados, ambos con un elevado valor de *bootstrap*. El clado T36, también tuvo un soporte estadístico del 100%, e incluyó todos los aislados de referencia de este genotipo más la muestra uruguaya 164, como en el caso de p20. Las muestras uruguayas 167 y MIL2012 formaron un clado con la cepa de referencia T3, con un apoyo del 99%. El *cluster* formado por los aislados de referencia del genotipo VT, tuvo un apoyo del 99% y mostró dos subgrupos. Uno de ellos formado por la cepa de referencia NZ-M16, el subgrupo VT occidental (VT, FL202, FS02-2, FS701, FS703) y las muestras uruguayas 119, 123, 124, 125, 163 y 166, presentó un valor de *bootstrap* de 100%. El otro subgrupo, con un soporte estadístico de 98%, involucró a la muestra 122 y las muestras de Nueva Zelanda, India y EEUU así como las del subgrupo VT asiático descrito por Harper (2013). Por último, las muestras 120 y 165 no agruparon con ninguna cepa de referencia.

En la tabla 4.2 se detalla un resumen de los genotipos inferidos a partir de los árboles filogenéticos para los aislados uruguayos para los genes p25, p20 y p23.

**Tabla 4.2.** Genotipos inferidos a partir de los árboles filogenéticos para los distintos aislados uruguayos. Se resaltan en azul los aislados que presentan el mismo genotipo en los tres genes analizados. Los genotipos de las regiones marcadas con un signo de interrogación (?) no pudieron ser determinados. N/A: No Amplificado.

Muestra	p25	p20	p23
119	VT	VT	VT
120	SA	T3	?
121	SA	T3	N/A
122	SA	VT	VT
123	VT	VT	VT
124	VT	VT	VT
125	VT	VT	VT
163	N/A	N/A	VT
164	VT	T36	T36
165	SA	T3	?
166	SA	SA	VT
167	T3	T3	T3
168	N/A	T3	N/A
MIL2012	N/A	T3	T3

Cabe resaltar que, las cepas de referencia B165 de India, T68-1 de EEUU, NZ-B18 de Nueva Zelanda y CT14A de China pertenecen al genotipo T68 descrito por Harper (2013). También, el aislado NZ-M16 de Nueva Zelanda pertenece al genotipo T3, según dicha clasificación. Sin embargo, fue descrito en ese mismo artículo, que las cepas mencionadas previamente son cepas recombinantes, siendo la mitad 3' de sus genomas del genotipo VT. En todos los árboles realizados en el presente estudio se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲). Las secuencias de referencia de Argentina se indican con el nombre ARG, las de Brasil con la abreviación BRA en el nombre y las de Uruguay con UY. Los clones fueron nombrados con la siguiente nomenclatura: primero el número de muestra, luego el nombre del gen y por último el número de clon (Ejemplo: 164p25C4).

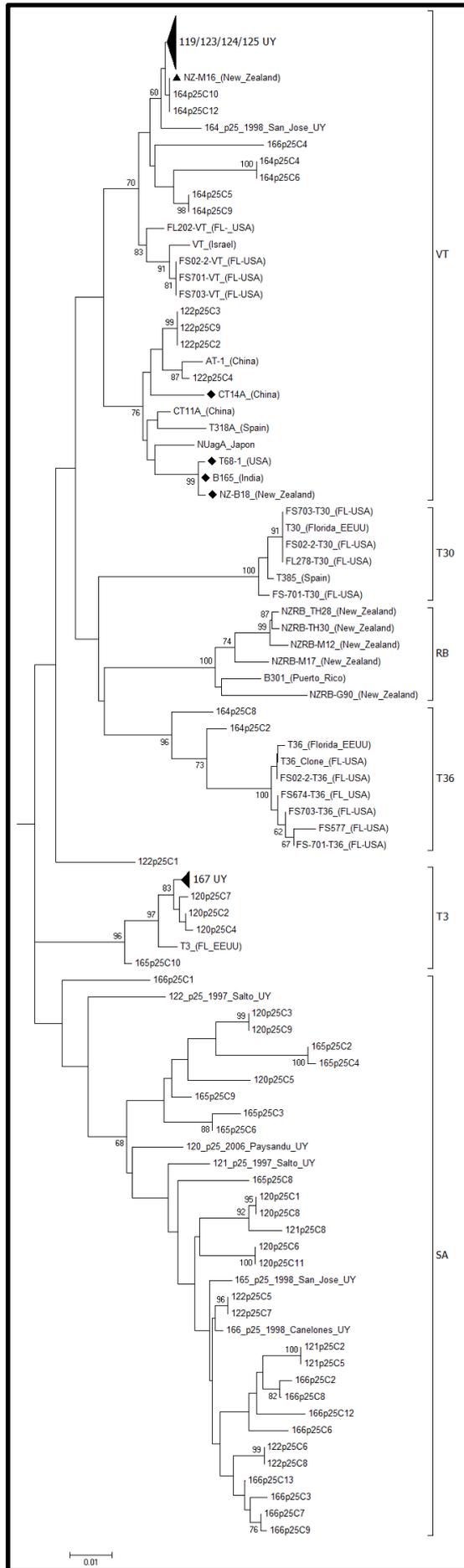
#### 4.7. Composición poblacional de los aislados uruguayos

Dada la co-circulación de distintos genotipos de CTV y la posible re-infección de un mismo árbol causada por el vector transmisor del virus, se analizaron los clones obtenidos de los distintos aislados uruguayos, con el fin de conocer en detalle la composición de los aislados uruguayos.

El árbol filogenético de la región p25 se realizó con un total de 138 secuencias de 630 pb, incluyendo 34 secuencias de referencia, 11 secuencias mayoritarias de Uruguay y 94 clones correspondientes a los aislados uruguayos (Tabla 4.1). El árbol mostró 6 grupos bien definidos (Figura 4.6). Los genotipos T30 y RB formaron dos *clusters* con un apoyo estadístico del 100% cada uno. Ninguna de las secuencias uruguayas, ya sea clones o secuencias mayoritarias, agruparon con estos genotipos. Los clones 2 y 8 de la muestra 164 agruparon con los aislados de referencia del genotipo T36, con un valor de *bootstrap* de 96. El clon 1 de la muestra 122 no agrupó con ninguna secuencia de referencia ni con aislados uruguayos. El clado T3 tuvo un soporte de 96% y se compuso por la cepa de referencia T3, la secuencia mayoritaria 167 y sus respectivos clones, 3 clones de la muestra 120 (C2, C4 y C7) y 1 clon de la muestra 165 (C10). Por otro lado, el clado VT involucró una gran cantidad de secuencias uruguayas. De las muestras 119, 123 y 124, las secuencias mayoritarias y sus respectivos clones agruparon en este clado. También se encontró la secuencia mayoritaria de la muestra 125 y 6 clones de la muestra 164 (C4, C5, C6, C9 y C12) así como la secuencia mayoritaria de la misma. Además, el clon 4 de la muestra 166, y los clones 2, 3, 4 y 9 de la muestra 122 también agruparon con cepas de

referencia del genotipo VT. Por último, se observó un clado formado por 34 secuencias de origen uruguayo, al que se decidió llamar Sudamérica (SA). En este *cluster* se encontraron las secuencias mayoritarias de las muestras 120, 121, 122, 165 y 166. También se observó la presencia de 7 clones de la muestra 120 (C1, C3, C5, C6, C8, C9 y C11), 3 clones de 121 (C2, C5 y C8), 4 clones de 122 (C5, C6, C7, C8), 6 clones de la muestra 165 (C2, C3, C4, C6, C8 y C9) y los clones 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 12 y 13 de la muestra 166.

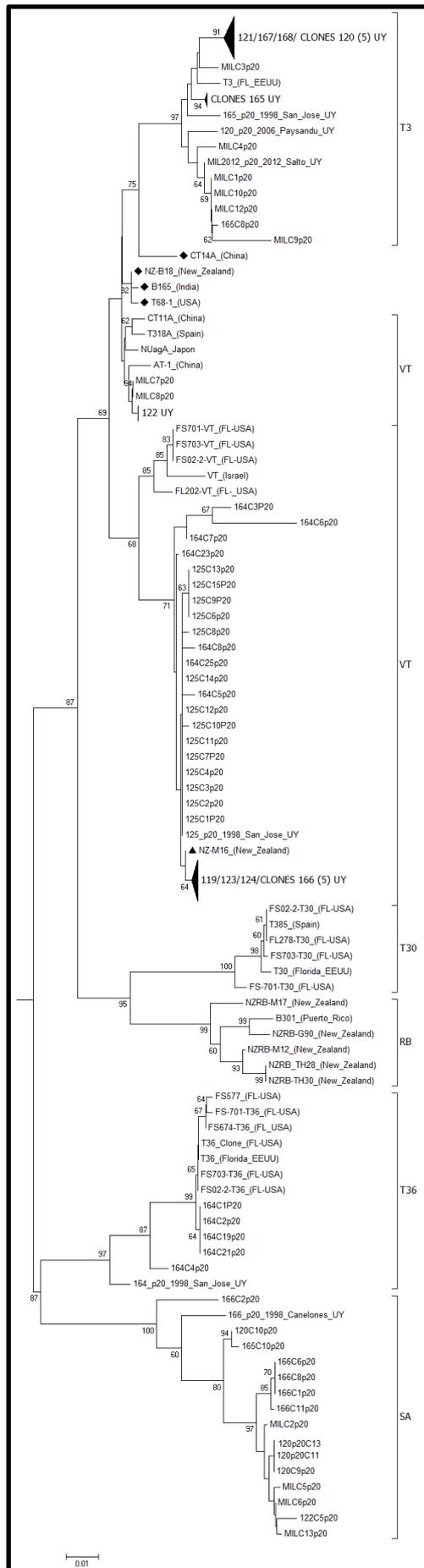
En resumen, se encontraron diferencias respecto a la agrupación de las secuencias mayoritarias y sus clones en las muestras 120, 122, 164, 165 y 166. Para la muestra 120, se encontraron 3 clones en el clado T3 y la secuencia mayoritaria más 6 clones en el clado SA. La secuencia mayoritaria de la muestra 122, así como 4 de sus clones, se observaron en el clado SA, mientras que otros 4 clones agruparon en el clado VT y uno no se ubicó en ninguno de los clados descritos. En el caso de 164, la secuencia mayoritaria y 6 clones agrupan en el *cluster* VT y los clones 2 y 8 corresponden al genotipo T36. Por último, para las muestras 165 y 166, sus secuencias mayoritarias, así como casi todos sus clones, agrupan en el clado SA, exceptuando el clon 10 de 165 que agrupa con T3 y el clon 4 de 166 que corresponde al genotipo VT.



**Figura 4.6.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p25. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (♦) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).

Para el análisis del gen p20 se realizó un árbol filogenético con 192 secuencias de 517 pb. Del total, 34 correspondieron a las secuencias de referencia (Tabla 3.4), 13 fueron las secuencias mayoritarias uruguayas y 145 fueron secuencias de los clones de los aislados uruguayos (Figura 4.7). Nuevamente, se observan los dos *clusters* formados por las cepas de los genotipos T30 y RB, con valores de *bootstrap* de 100 y 99, respectivamente. El clado formado por el aislado T3 incluye las secuencias mayoritarias con sus respectivos clones de las muestras 121, 165, 167 y 168, así como también la secuencia mayoritaria de 120 y 5 clones de esta muestra (C1, C2, C3, C5, C6 y C8) y la secuencia mayoritaria de la muestra MIL2012 con sus clones 1, 3, 4, 9, 10 y 12. En cuanto al genotipo VT, se observaron dos grupos, uno de los cuales incluye las cepas de referencia del subgrupo VT asiático, 2 clones de la muestra MIL2012 (C7 y C8) y la secuencia mayoritaria de 122 con sus respectivos clones. El otro grupo incluye las secuencias del subgrupo VT occidental y la secuencia NZ-M16, así como los clones y las secuencias mayoritarias de las muestras 119, 123, 124 y 125. También se encuentran en este grupo 6 clones de la muestra 164 (C3, C5, C6, C7, C8, C23 y C25) y 5 clones de la muestra 166 (C3, C4, C5, C7 y C9). Por otro lado, la secuencia mayoritaria del aislado 164 y 5 de sus clones (C1, C2, C4, C19 y C21) agruparon junto a las secuencias de referencia del genotipo T36. Por último, al igual que en el caso de p25, se observó un clado formado por secuencias exclusivamente uruguayas. En este caso un total de 16 secuencias conformaron este clado, siendo 4 de ellas clones del aislado 120 (C9, C10, C11 y C13), el clon 5 de la muestra 122, el clon 10 de la muestra 165, la secuencia mayoritaria y los clones 1, 2, 6, 8 y 11 del aislado 166 y 4 clones de la muestra de campo MIL2012 (C2, C5, C6 y C13). El soporte estadístico para este grupo fue del 100%. Este clado SA se encuentra formado por representantes de las mismas muestras que el clado SA de p25, excepto el aislado 121.

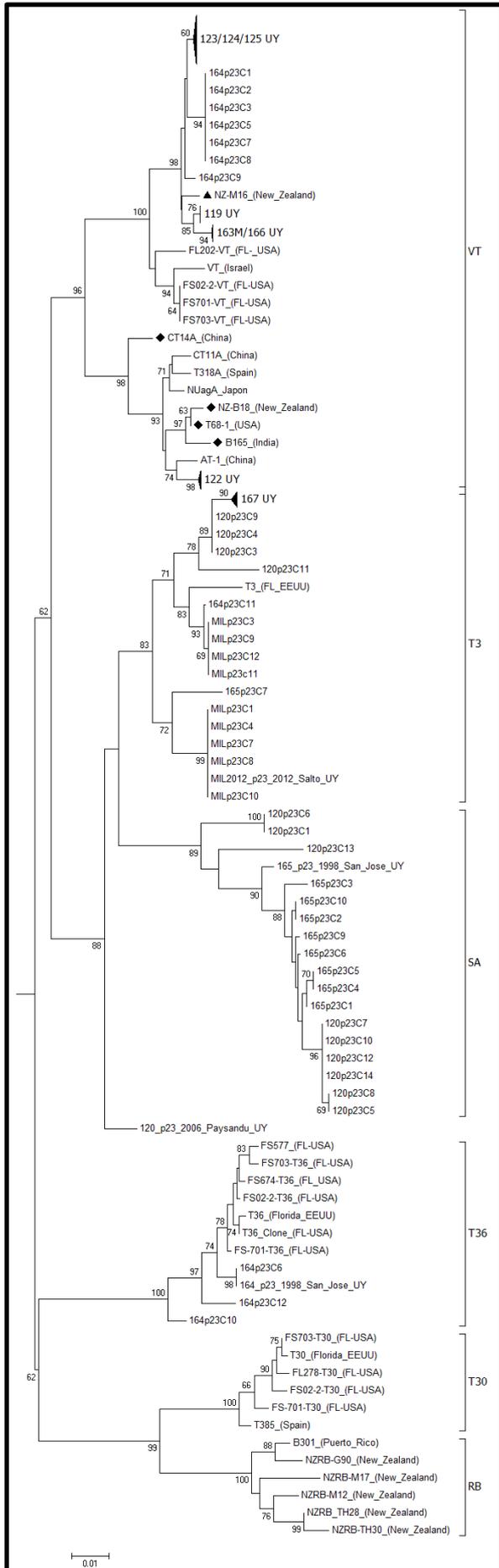
Entonces, se pudo observar que las muestras 122, 164, 165, 166 y MIL2012, presentan genomas de distintos genotipos en su estructura poblacional.



**Figura 4.7.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p20. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).

Por último, el análisis para el gen p23 se realizó con 161 secuencias en total, cada una de ellas con un largo de 625 pb. Se incluyeron las 34 secuencias de referencia (Tabla 3.4), 11 secuencias mayoritarias de los aislados uruguayos y 116 clones.

Como se observa en la figura 5.8, el árbol mostró 6 grupos con altos valores de *bootstrap*. Los clados correspondientes a los genotipos T30 y RB mostraron un soporte estadístico de 100% cada uno. El clado T36, con un apoyo estadístico de 100%, contiene la secuencia mayoritaria y los clones 6, 10 y 12 del aislado 164, así como las secuencias de referencia de T36. También se observó el clado T3, con un valor de *bootstrap* de 83%, en el que se encuentran las muestras 167 y MIL2012 con sus respectivos clones, 4 clones de la muestra 120 (C3, C4, C9 y C11), el clon 11 de la muestra 164, el clon 7 de la muestra 165 y la secuencia de referencia T3. Por otro lado, el apoyo estadístico para el clado VT fue de 96%, y este se subdividió en dos subgrupos. El subgrupo que incluye los aislados VT asiáticos se agrupó con un 98% de apoyo estadístico con el aislado 122 y sus clones, así como con los aislados del genotipo T68, que presentan un genoma VT en esta región. El subgrupo que incluye los aislados VT occidentales, estuvo formado por las muestras 119, 123, 124, 125 y 166, incluyendo clones y secuencias mayoritarias. También se encontraron 7 clones del aislado 164 (C1, C2, C3, C5, C7, C8 y C9) y la secuencia mayoritaria del aislado 163. Por último, también se encontró un clado SA para este gen, formado por 18 secuencias uruguayas correspondientes a las muestras 120 y 165. De la primera se encontraron 9 clones (C1, C5, C6, C7, C8, C10, C12, C13 y C14) y de la segunda, su secuencia mayoritaria y los clones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9 y 10.



**Figura 4.8.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p23. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◊) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).

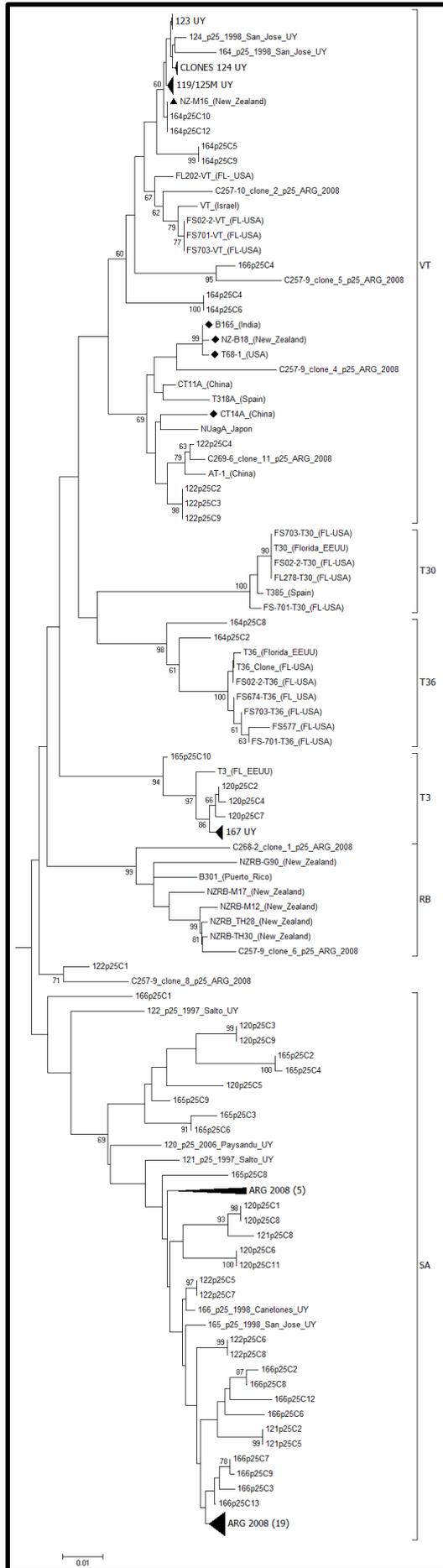
#### 4.8. Análisis filogenético de CTV a nivel regional

Posterior al análisis de la composición de los aislados uruguayos se incluyó en el estudio filogenético cepas de Argentina y Brasil, con el objetivo de realizar una comparación de las cepas que circulan en la región.

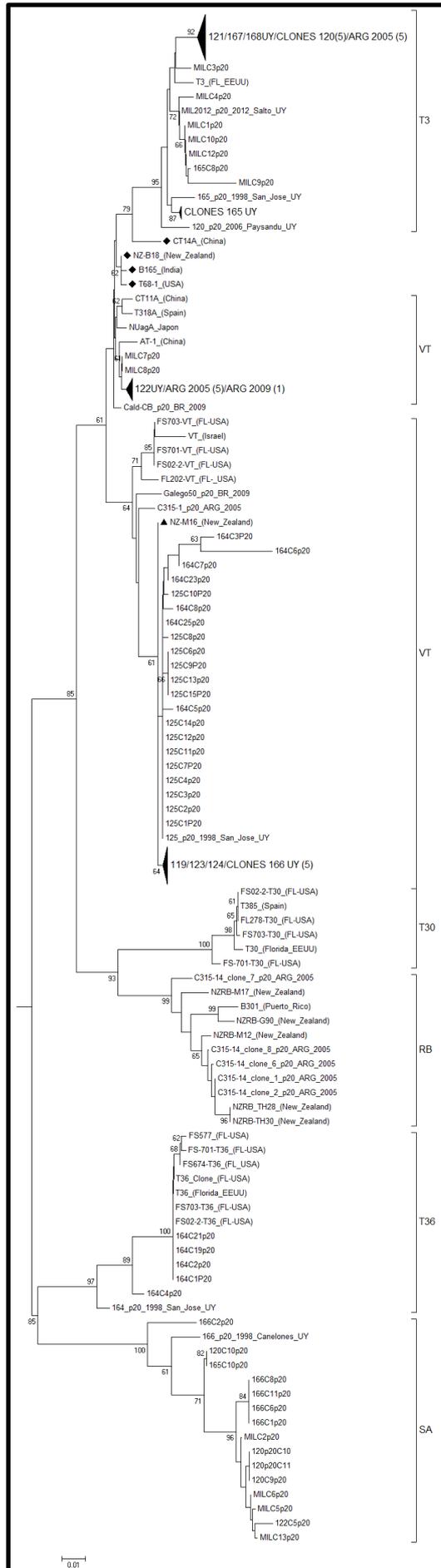
Se agregaron 31 secuencias de Argentina, tomadas del estudio realizado por Iglesias y colaboradores, 2008, al análisis de p25, obteniendo un árbol con un total de 169 secuencias de 630 pb y una topología similar al árbol de la figura 4.5 (Figura 4.9). Ninguna de las secuencias Argentinas agrupó con los genotipos T30, T36 ni T3. Sin embargo, 13% de las secuencias (4/31) agruparon en el clado VT, un 6% agruparon con los aislados del genotipo RB (2/31) y una sola de ellas agrupó con el clon 1 del aislado 122 (3%) y ninguna de las secuencias de referencia. El resto de los aislados argentinos, que representan el 78% (24/31) de los mismos, agrupó con las secuencias uruguayas del clado SA con un valor de *bootstrap* de 69%.

Para el análisis del gen p20, se agregaron 17 secuencias de Argentina del año 2005 (Iglesias *et al.*, 2005) y 3 secuencias obtenidas de Martín y colaboradores, 2009 (2 de Brasil y 1 de Argentina). Con un total de 212 secuencias, de 517 pb de longitud, se construyó el árbol filogenético que se muestra en la figura 4.10. Las secuencias obtenidas del estudio de Iglesias agruparon con los genotipos T3 (6/17), VT (7/17) y RB (4/17) y las 3 secuencias obtenidas del trabajo del año 2009 agruparon en el clado VT. Ninguna de ellas agrupó en el clado SA formado por secuencias exclusivamente uruguayas.

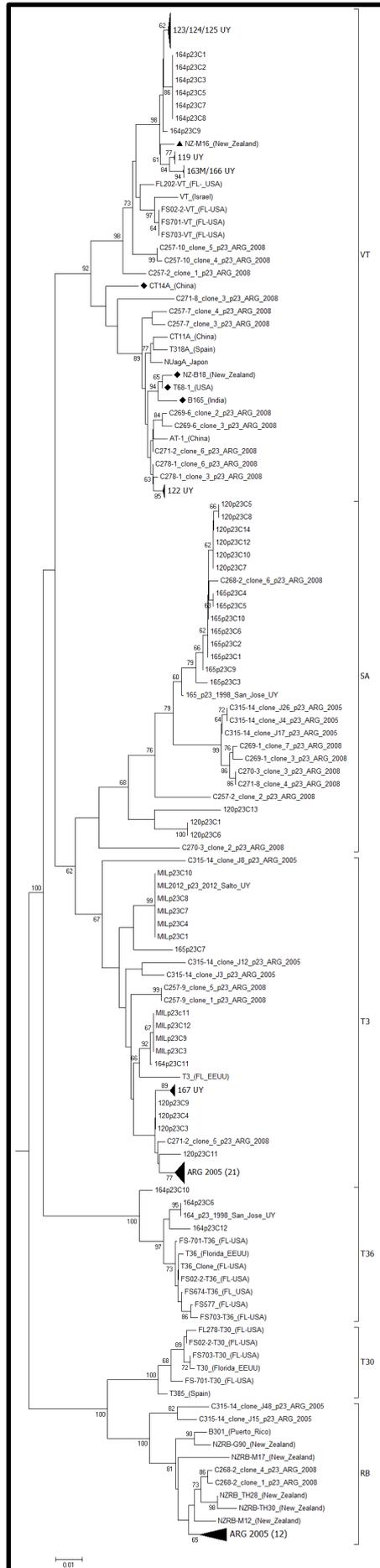
Por último, las 64 secuencias argentinas utilizadas para el análisis del gen p23, fueron obtenidas de dos estudios de Iglesias y colaboradores, publicados en los años 2005 y 2008. En este caso, el análisis contó con un total de 225 secuencias de las cuales 41 fueron tomadas del estudio del 2005 y 23 del estudio del 2008. La topología del árbol obtenido fue similar al obtenido para el análisis de las secuencias uruguayas (Figura 4.11). En el clado VT, agruparon 11 secuencias Argentinas del año 2008, con un soporte estadístico del 92%. Por otro lado, 24 secuencias del año 2005 y 3 secuencias del año 2008 agruparon con el genotipo T3, con un valor de *bootstrap* de 67. En el clado del genotipo RB encontramos 14 secuencias del 2005 y 2 secuencias del 2008, con un apoyo del 100%. Por último, 3 secuencias del 2005 y 6 secuencias del 2008, agruparon en el clado SA, de cepas sudamericanas.



**Figura 4.9.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p25. Se incluyen los aislados argentinos. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).



**Figura 4.10.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p20. Se incluyen los aislados de Argentina y Brasil. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).

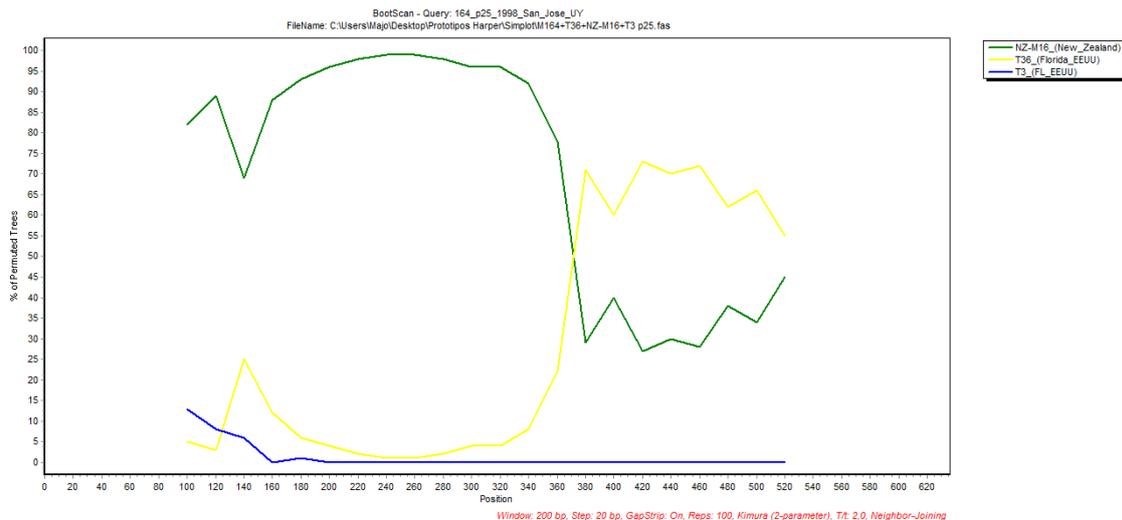


**Figura 4.11.** Reconstrucción filogenética por el método de Neighbor Joining de la región correspondiente al gen p23. Incluye los aislados argentinos. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).

#### 4.9. Estudio de secuencias recombinantes

Luego del análisis de los árboles filogenéticos, se sospechó la presencia de secuencias recombinantes. Con el objetivo de corroborar estos resultados se realizó el análisis de las muestras 164, 165 y 166 mediante los programas Simplot, Bootscan, GARD y SBP.

En este análisis se compararon los aislados 164, 165 y 166 con las secuencias de referencia. El análisis de los 3 genes por separado reveló indicios de recombinación en la muestra 164 para el gen p25, por lo que se realizó un análisis posterior con los posibles parentales. Estos eran las secuencias NZ-M16 correspondiente al genotipo T3, pero con la región p25 del tipo VT por tratarse de una secuencia recombinante, y la secuencia T36, secuencia de referencia del genotipo T36. El resultado del *Bootscan* se muestra en la figura 4.12.

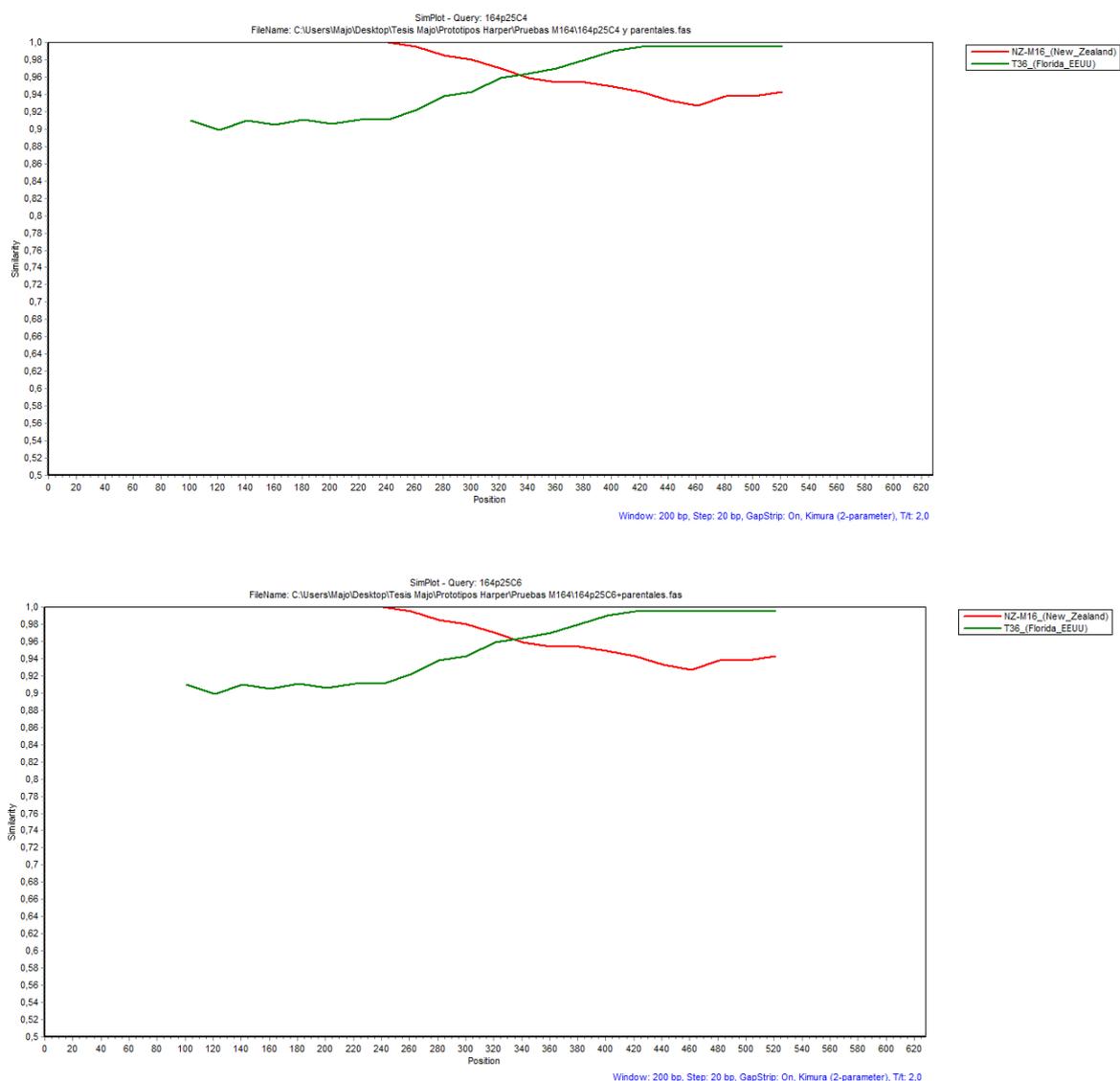


**Figura 4.12.** Análisis de recombinación mediante *Bootscan* del aislado 164. Se incluyen las secuencias de referencia NZ-M16 (verde), T36 (amarillo) y T3 (azul).

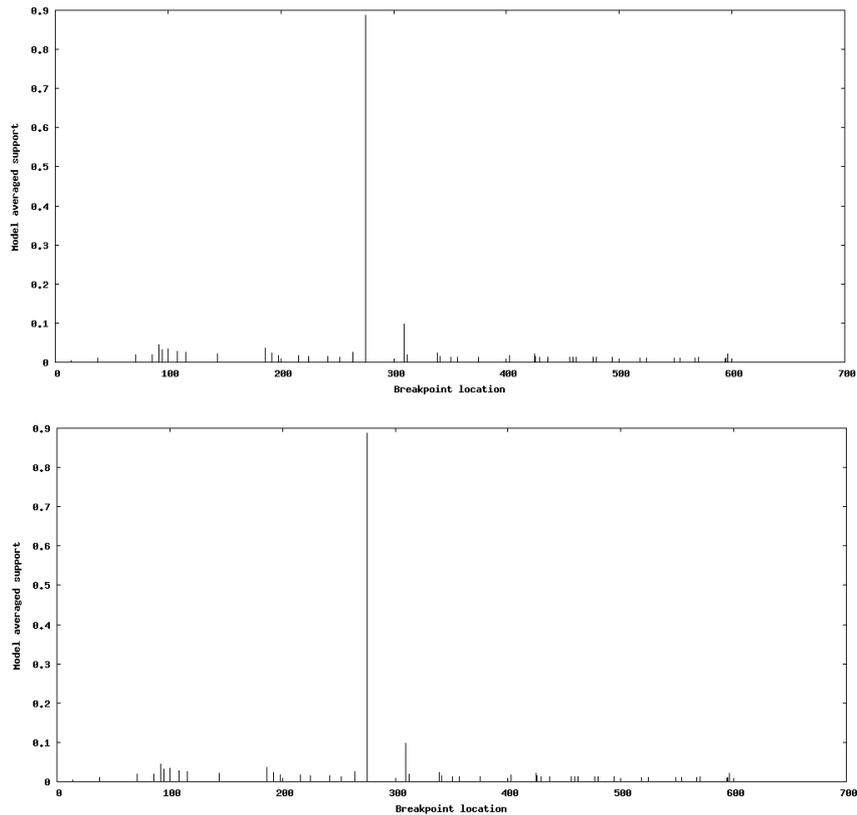
Sin embargo, cuando se realizó el estudio del aislado 164 con sus posibles parentales mediante el algoritmo GARD, no se encontró evidencia de recombinación (dato no mostrado).

Con el objetivo de corroborar la presencia de las cepas parentales en la planta de la cual se obtuvo la muestra 164, se decidió analizar los clones obtenidos para este aislado, ya que como se puede observar en las figuras 4.6 y 4.9, los clones 2 y 8 agrupan con el genotipo T36 y los clones 10 y 12 con la secuencia NZ-M16. También se observan los

clones 5 y 9 en el clado VT, y los clones 4 y 6, aunque estos últimos parecen ser bastante divergentes de los que agrupan con NZ-M16. El análisis de los clones, según el GARD, con las supuestas secuencias parentales, reveló que los clones 4 y 6 presentan un punto de recombinación en la posición 274 del fragmento de p25, siendo el extremo 5' proveniente del parental NZ-M16 y el extremo 3' del parental de origen T36 (Figuras 4.13 y 4.14). El algoritmo SBP confirmó la presencia del punto de recombinación para ambos clones en la posición 274. El análisis mediante el *Simplot* muestra el punto alrededor de la posición 290, lo que es coherente con los resultados del GARD y el SBP (Figura 4.13).



**Figura 4.13.** Análisis de los clones 4 (arriba) y 6 (abajo) mediante *Simplot* con las secuencias parentales NZ-M16 y T36



**Figura 4.14.** Resultado del GARD para los clones 4 (arriba) y 6 (abajo) del aislado 164. Se muestra el punto de recombinación dentro de la secuencia.

En cuanto a los clones 2, 5, 8, 9 10 y 12 no mostraron evidencia de recombinación.

Por último, se realizó el análisis de la secuencia mayoritaria del aislado 164, comparándola con los clones 8 y 10 y no se encontró evidencia de que estos fueran los parentales.

En conclusión, se encontró que la secuencia mayoritaria del aislado 164 es recombinante en el gen p25 al igual que los clones 4 y 6 de este aislado. Sin embargo, los parentales de la secuencia mayoritaria no se pudieron definir, aunque presentan una alta similitud con las secuencias parentales de los clones recombinantes, NZ-M16 y T36.

#### 4.10. Análisis de coalescencia

A través del análisis de coalescencia, se estimó la tasa de sustitución y la edad del ancestro común más reciente del clado SA para el gen p25.

Previo al análisis de coalescencia se realizó un árbol filogenético con el método de Máxima Verosimilitud, para confirmar la monofilia del clado SA (Figura 5A Anexo). Se observó que las secuencias de este grupo son monofiléticas con un valor de aLRT de 0.97.

También se analizaron las secuencias que conforman dicho clado en busca de cepas recombinantes. Para este análisis se utilizaron las metodologías utilizadas en la sección 4.3. El resultado mostró que los clones 3, 5, y 9 del aislado 120 y los clones 2, 3, 4, 6 y 9 de la muestra 165, que forman un subgrupo dentro del clado, son secuencias recombinantes. Por este motivo fueron eliminadas del análisis de coalescencia.

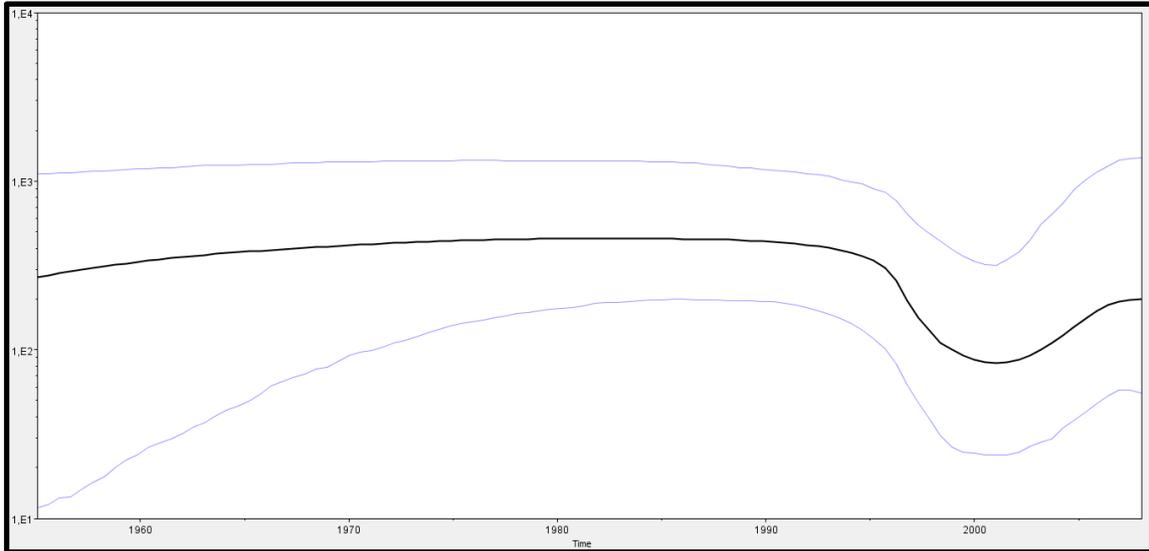
Para el análisis se utilizaron 49 secuencias procedentes de Uruguay y Argentina, datadas entre los años 1997 y 2008. El reloj molecular que mejor se ajustó a los datos analizados fue un reloj relajado Log normal.

La tasa de evolución obtenida por este análisis fue de  $2.89 \times 10^{-4}$  con un rango de variación entre  $1.97 \times 10^{-4}$  y  $3.91 \times 10^{-4}$  nt/sitio/año con un 95% de confianza.

El tMRCA calculado fue de 94 años, lo que indica que el ancestro del clado SA se habría originado en 1920. El intervalo de confianza está entre los 53 y 145 años, por lo que el origen estaría entre los años 1869 y 1961 con un 95% de confianza.

Por otro lado, el análisis de Skyline mostrado en la figura 4.15, reveló un leve incremento en la circulación de genotipos del clado SA hasta 1960, el cual se mantuvo constante hasta el año 1995 aproximadamente. En este año, se observa un descenso brusco de la circulación de este genotipo, comenzando a aumentar nuevamente alrededor de los años 2003-2004, sin mostrar algún descenso hasta la fecha.

**Figura 4.15.** Análisis de *Skyline* donde se observa la evolución del tamaño poblacional del clado SA entre los años 1960 y 2010.



## 5. DISCUSIÓN

Los cítricos son el cultivo frutal más importante a nivel económico en todo el mundo. Sin embargo, las distintas especies de cítricos son susceptibles a numerosas enfermedades causadas por diversos microorganismos, como virus, viroides y bacterias, que producen síntomas similares en las diferentes dolencias que producen (Moreno *et al.*, 2008). Es por esto que el diagnóstico a través de la observación de los árboles puede no ser certero, por lo que la utilización de metodologías de diagnóstico alternativas es de gran importancia.

En Uruguay, el diagnóstico de CTV se ha basado siempre en el testaje biológico y en ensayos de ELISA (Mamán, 1996; Francis, 1997). Sin embargo, estas técnicas son laboriosas y consumen mucho tiempo (meses para los testajes biológicos). Además, las técnicas inmunoenzimáticas no presentan una sensibilidad tan elevada como las técnicas moleculares. En el presente estudio, se implementó el desarrollo de una metodología de diagnóstico rápida, sencilla y precisa, mediante la utilización de PCR en tiempo real con metodología TaqMan. A nuestro saber, el método diagnóstico aquí desarrollado constituye el primer desarrollo en Uruguay de detección específica del genoma de CTV.

Previo al estudio de PCR en tiempo real, 11 de las 13 muestras fueron analizadas por ELISA en el INIA con el anticuerpo MCA13. Solamente seis de las muestras fueron positivas por este método, mientras que tres fueron negativas y en dos el resultado no fue concluyente. A su vez, en este estudio se analizaron estas muestras por PCR en tiempo real, utilizando tres regiones diferentes del genoma (genes p25, p20 y p23) y no se obtuvieron resultados positivos en el 100% de los casos, con la salvedad de que al menos un gen por muestra se logró amplificar. Sin embargo, mediante la PCR en tiempo real, todas las muestras analizadas fueron amplificadas correctamente.

La amplificación inicial de las distintas muestras ocurrió en distintos ciclos de la corrida, pudiendo deberse a la presencia de distinta carga viral en las mismas. Cabe resaltar que varios problemas ocurrieron durante la amplificación por PCR en tiempo real de las muestras 163 y 168, logrando amplificar solamente un gen para cada una de ellas. Una de las posibles explicaciones a lo ocurrido, puede ser la presencia de una baja carga viral en las muestras, lo que concuerda con los resultados de PCR en tiempo real, que muestra que tuvieron su ciclo umbral en el ciclo 32, el más tardío de todos los ciclos. De todas

maneras, este punto puede ser tomado como una fortaleza de la metodología, ya que la misma es capaz de detectar muestras incluso con baja concentración del virus. Por esto, consideramos que la utilización de una región conservada del genoma de CTV, como la región 3'UTR, para la detección por PCR en tiempo real, así como la alta sensibilidad de la metodología, nos permite utilizar esta técnica para el análisis masivo de muestras de forma rápida y precisa. Esta metodología descrita por Bertolini y colaboradores (2008), ha mostrado resultados robustos y ha permitido el análisis masivo de muestras de campo en España.

El sector citrícola nacional posee una potencialidad productiva muy superior a la actual. Sin embargo la presencia de CTV en el país genera pérdidas millonarias anualmente, las cuales pueden aumentar en el futuro, si no se procede a encontrar una solución de fondo que permita a mediano plazo una mejora sustantiva en los niveles de producción.

Como se mencionó previamente, existen varios métodos para controlar CTV, que dependen del estado de afectación de la región, lo que incluye, la presencia del vector transmisor, las variedades de cítricos cultivadas y las cepas circulantes del virus (Garnsey et al., 1998). En Uruguay, CTV y el áfido vector *T. citricida* son endémicos, por lo que, además de metodologías de diagnóstico eficientes para el monitoreo de los campos, se requieren dos medidas de control adicionales. Por un lado, la importancia de tener un buen programa de saneamiento y certificación de material y por otro, implementar un programa de protección cruzada (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987).

El programa de saneamiento y certificación de material, a cargo del INIA, comenzó en el año 1990 y continuó ininterrumpidamente hasta el año 2004, donde tuvo un receso y fue retomado nuevamente en el año 2010 (Maeso & Bertalmío, 2002). Este programa se encarga de liberar a campo variedades libres de diferentes patógenos, incluido CTV. Sin embargo, el estado de situación actual del país, en cuanto a las cepas de CTV circulantes, es desconocido. Por esta razón, nos propusimos en la presente tesis estudiar y poner a punto metodologías que permitan caracterizar, y de esta manera conocer en profundidad, las poblaciones del virus que se encuentran en el país, con el objetivo último y a largo plazo de implementar un plan de protección cruzada. A su vez, el hecho de contar con muestras colectadas en el pasado, como las utilizadas en esta tesis, que fueron obtenidas del banco de muestras del INIA, nos brinda información histórica invaluable de la ocurrencia de los aislados de CTV en la historia reciente del Uruguay.

El abordaje utilizado por los grupos de investigación de distintas partes del mundo, para la caracterización genética de CTV, incluye la utilización de diversas partes del genoma del virus, o en los últimos años, genomas completos (Rubio *et al.*, 2001; Iglesias *et al.*, 2005, 2008; Jiang *et al.*, 2008; Herrera-Isidrón *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2009; Melzer *et al.*, 2010; Ayazpour *et al.*, 2011; Biswas *et al.*, 2012a, 2012b; Davino *et al.*, 2013; Harper, 2013; Scott *et al.*, 2013). Lamentablemente, la utilización de distintos genes a la hora de caracterizar CTV, presenta inconvenientes al momento de realizar estudios comparativos. Es así, que la elección de la metodología utilizada en el presente estudio, fue basada en los siguientes criterios: por un lado, los genes utilizados para la caracterización de CTV fueron ampliamente utilizados por varios grupos de investigación por el grado de información genética de los mismos, incluyendo los pocos trabajos publicados para Argentina y Brasil (Iglesias *et al.*, 2005, 2008; Martin *et al.*, 2009). Por otro lado, la utilización de la nueva clasificación propuesta en seis genotipos, acompaña la gran divergencia mostrada por las distintas variantes de CTV que se ha incrementado en los últimos años, hecho demostrado por la continua aparición de nuevos genotipos (Harper *et al.*, 2010; Melzer *et al.*, 2010; Biswas *et al.*, 2012a).

Si se compara la clásica clasificación en tres grupos de virulencia suave, intermedia y severa, con la nueva clasificación en seis genotipos, se pueden correlacionar de la siguiente manera: el genotipo T30 corresponde a las cepas suaves, el T36 a las de virulencia intermedia y los restantes cuatro genotipos (VT, T68, RB y T3) estarían agrupando cepas severas con diferencias a nivel de secuencia y de sintomatología (Biswas *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2013).

Los análisis filogenéticos de las secuencias mayoritarias de los aislados uruguayos para el gen p25, revelaron la presencia de 3 genotipos (VT, T3 y SA) mientras que en los análisis de los genes p20 y p23 se observó el genotipo T36 además de los anteriores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en los subsiguientes árboles, cuando se incluyen los clones de los aislados uruguayos y las secuencias de Argentina y Brasil. La presencia de genotipos tipo VT fue la mayoritaria, lo que concuerda con los datos reportados en Argentina y Brasil (Iglesias *et al.*, 2005, 2008; Martin *et al.*, 2009) y en otras partes del mundo, que lo describen como el genotipo más prevalente (Hilf *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2005; Harper *et al.*, 2010), reforzando los resultados obtenidos en este estudio.

Por otro lado, el genotipo T36 no fue reportado previamente en la región, mientras que si fue encontrado en Argentina el genotipo T30 (Iglesias *et al.*, 2005). Esto podría deberse a la importación desde diferentes países hacia Argentina o Uruguay, de árboles infectados con distintos genotipos. Sin embargo, al utilizar una clasificación diferente a la utilizada por Iglesias, el hecho de que ciertos genotipos no hayan sido descritos por el autor, no significa que no estén presentes, como se observa en el caso de las secuencias argentinas que agruparon en el clado RB en los tres genes analizados en este estudio.

En cuanto al genotipo T3, el segundo en prevalencia en los datos uruguayos, no ha sido descrito hasta el momento en países de la región, aunque el motivo puede ser el que se describió previamente.

Por último, la descripción del clado llamado SA en este trabajo, muestra que existe una estrecha relación entre las cepas que circulan en Uruguay y en Argentina. La cercanía entre ambos países, facilita la circulación de plantas en la región, además de las condiciones ambientales similares que pueden haber influido en la divergencia de este grupo. Este punto es realmente interesante, ya que significa que el virus está evolucionando de manera local, es decir, diferenciándose genéticamente del resto de los aislados de la región.

Como se ha descrito previamente, la organización poblacional de CTV está dividida en dos niveles de complejidad, uno que incluye las cepas o genotipos existentes en la población, como se discutió previamente, y otro relacionado con las variantes de secuencias minoritarias en torno a la secuencia maestra o mayoritaria (Harper, comunicación personal). Es sabido que las secuencias minoritarias pueden ser importantes en la manifestación de síntomas de una enfermedad, a pesar de que se encuentren en baja proporción (Cerni *et al.*, 2008).

El análisis de los clones obtenidos en este trabajo, nos permite analizar un panorama de la composición genética de cada aislado. Si se comparan los árboles filogenéticos obtenidos con las secuencias mayoritarias y con los que incluyen los clones de los aislados uruguayos, se puede observar la diversidad de genotipos presentes en las poblaciones. En algunos aislados uruguayos, como 119, 123, 124, 125 y 167, se observó que las poblaciones fueron homogéneas, siempre agrupando los clones con las secuencias mayoritarias en el genotipo VT. Sin embargo, en el resto de los aislados los resultados fueron variables, dependiendo del gen y del aislado a considerar. La excepción fue para los

aislados 164 y MIL2012, que en todos los casos se observaron variantes de secuencias en diferentes clados. El análisis en profundidad de las poblaciones de CTV es de suma importancia para la implementación de un plan de protección cruzada. Se ha descrito previamente, que la causa de la disminución de la eficacia del aislado protector GFMS12, utilizado en Sudáfrica eficientemente desde 1984, se debe a la presencia de varios genotipos en el aislado (Scott *et al.*, 2013). Varias asunciones se pueden hacer al respecto. En cuanto a los aislados homogéneos, podemos suponer que las plantas estaban infectadas por el genotipo VT previo a la colecta de las mismas, asunción lógica ya que es el genotipo más prevalente, y que al ser mantenidos *in planta* durante todos estos años y fuera del alcance del insecto vector, las poblaciones se mantuvieron sin introducción de variantes virales diferentes. Es decir, sin el aporte de nuevos genotipos con los cuales recombinar y dada la baja tasa de evolución de CTV comparada con otros virus RNA, es probable que este haya sido el escenario más probable. En cuanto a los aislados que muestran distintos genotipos, dos escenarios son posibles. Por un lado, podemos asumir que las plantas estaban coinfectadas con más de un genotipo, y lo que estamos observando es la amplificación de los mismos en los distintos genes, lo que serían sucesos independientes. Por otro lado, podríamos asumir que los genomas de las plantas son recombinantes, evento ampliamente descrito en CTV, y lo que observamos al amplificar los distintos genes son en realidad fragmentos del mismo genoma. También podrían existir ambos escenarios combinados, aunque cualquiera de ellos es difícil de demostrar con los datos obtenidos en este trabajo. Para demostrar que el genoma infectivo es recombinante deberíamos amplificar el fragmento completo desde el gen p25 hasta p23, en un único evento de amplificación, y encontrar allí el punto de recombinación. O por otro lado, encontrar el punto de recombinación dentro de los fragmentos amplificados, como ocurrió en el caso del aislado 164. Cabe destacar, que el aislado MIL2012 es un aislado de campo, colectado recientemente y que no estuvo mantenido *in planta* aislado del vector, lo que significa, que en la actualidad los árboles continúan coinfectados. Además, este aislado fue el que presentó mayor diversidad de genotipos en los clones analizados. Sin embargo, sabemos que un  $n=1$  no es para nada significativo como para sacar conclusiones, y la necesidad de continuar analizando aislados de campo permanece latente.

Otro punto interesante a destacar, como se mencionó anteriormente, es la presencia de aislados recombinantes. La incongruencia en la clasificación de los distintos genes de

los aislados 164, 165 y 166, llamó nuestra atención. Para corroborar que no se tratara de genomas de distintos genotipos, como se planteó en el párrafo anterior, se realizaron distintos análisis con herramientas que permiten descubrir secuencias recombinantes. Al comparar las secuencias mayoritarias de los aislados con las secuencias de referencia, se observó que solamente el aislado 164 en el gen p25 presentaba un evento de recombinación. Los resultados del *SimPlot* y *Bootscan*, mostraban que los posibles parentales eran las secuencias NZ-M16 de Nueva Zelanda y T36 de EEUU. Sin embargo, no fue posible detectar recombinación en este fragmento utilizando el GARD. La explicación a esta incongruencia, creemos que se debe a que la secuencia recombinante ya es divergente de la secuencia parental T36, hecho que se puede interpretar de la gráfica del *Bootscan* (Figura 4.12). Cuando se analizaron las secuencias de los clones del aislado 164 con las secuencias NZ-M16 y T36, se observó que dos de ellos, los clones 4 y 6, presentaron un evento de recombinación ubicándose en la posición 274 del fragmento (Figuras 4.13 y 4.14). El resto de los clones analizados no presentó evidencia alguna de recombinación con dichas secuencias de referencia. Tampoco se encontró evidencia de que alguno de los clones sea la secuencia parental tipo T36 de la secuencia mayoritaria recombinante del aislado 164. Por lo tanto, podemos concluir que el aislado 164 está compuesto por secuencias recombinantes entre NZ-M16 y T36 y secuencias similares a T36 y NZ-M16, aunque alguno de estas secuencias recombinantes divergieron de la secuencia recombinante original, motivo por el cual no se pueden identificar los parentales. El hecho de que la secuencia recombinante divergente haya sido la mayoritaria, nos indica que esta se encuentra en mayor proporción dentro de la planta. Teniendo en cuenta de que el aislado 164 fue colectado en 1998 y mantenido hasta el momento de su análisis en un huésped diferente del cual fue colectado, podríamos suponer que el cambio en las presiones selectivas provistas por el nuevo huésped generó un ambiente más permisivo en el cual el genotipo recombinante fue más eficiente, aumentando de esta manera en la población. También el cambio de huésped podría explicar la divergencia respecto a la secuencia recombinante original (clones 4 y 6). Una forma de corroborar esta hipótesis, sería inocular una planta de *Citrus limón*, variedad de la cual fue colectada la muestra, e inocularla con el aislado 164, analizando posteriormente la composición de la población.

Otros aislados que resultaron recombinantes, aunque no se pudo identificar los parentales, se encontraron en el clado SA para el gen p25, formando un subgrupo dentro de este genotipo (ver Sección 4.2.6). Los resultados del *SimPlot* para estos clones, cuando

se compararon con las secuencias de referencia, mostraron que todos ellos presentan una elevada similitud a la secuencia de referencia T3, aunque no alcanzan el 100% (datos no mostrados). Esto demuestra, como en el caso del aislado 164, que ha ocurrido cierta divergencia entre estas secuencias recombinantes y el aislado T3, aunque harían falta más estudios para confirmar esta conclusión. El objetivo de analizar estos clones, hecho que ocurrió previamente al análisis de coalescencia, fue el de incluir en el estudio solamente aislados no recombinantes y excluir los recombinantes. Este punto es de suma importancia para el análisis, ya que se podría estar mezclando historias evolutivas diferentes.

El análisis de coalescencia nos permitió establecer el ancestro común más reciente del clado SA. Este genotipo se habría originado en Sudamérica alrededor de 1920, lo que concuerda con evidencia reportada por Roistacher en una revisión realizada en 2010, teniendo en cuenta el intervalo de confianza reportado en el análisis. Allí se detalla, que en 1930 se habrían importado distintas variedades de cítricos desde Sudáfrica, probablemente infectadas con CTV, siendo esta la evidencia más antigua con la que se cuenta del movimiento transoceánico de material vegetal hacia Sudamérica. En cuanto a la tasa de evolución obtenida con nuestros datos, esta se encuentra dentro del rango de la tasa de evolución descrita por Silva y colaboradores (2012) para este gen, lo que le otorga robustez al análisis. Esta tasa de evolución, que se encuentra en el orden de  $10^{-4}$  sustituciones/sitio/año, también se encuentra en el rango de la tasa de evolución descrita para el gen p20 (Davino *et al.*, 2013). Sin embargo, la tasa de evolución descrita por Harper (2013) para el genoma completo fue de  $1.73 \times 10^{-5}$  sustituciones/sitio/año. Esta diferencia puede deberse a la forma en que ésta fue calculada, llevando a una posible subestimación de la misma, como explica el autor.

El análisis de coalescencia, mediante la herramienta de *Skyline*, nos permitió observar el comportamiento de la población del genotipo SA en el tiempo. Este análisis reveló un leve incremento del tamaño de la población desde su origen hasta 1960, que se mantuvo hasta 1995 aproximadamente. Este aumento en el tamaño efectivo de la población pudo deberse al nuevo genotipo en fase de expansión en un nuevo ambiente hasta que alcanza la fase estacionaria donde se adaptó a los nuevos huéspedes. Sin embargo, en 1995 se observa una severa disminución en el tamaño poblacional comenzando a recuperarse nuevamente entre los años 2003-2004. Si tomamos en cuenta que el Plan Nacional de Saneamiento de Cítricos comenzó en 1990, el declive de la población en 1995 podría deberse al efecto producido por la liberación de material saneado y al aumento de control

de plantas infectadas en el campo con su consiguiente eliminación. El cese del plan en el 2004, explica el incremento de la población viral en esos años, el cual continúa hasta aproximadamente el 2010, que es cuando se retoma la implementación de Plan de Saneamiento. Como se observa en la figura 4.15, a pesar de que la población viral comienza a aumentar hace 10 años atrás, el tamaño alcanzado por la misma es menor al que tenía inicialmente, previo el descenso de 1995. A su vez, parece encontrarse en una fase estacionaria nuevamente hasta el 2012, último año de obtención de las muestras analizadas. La realización de futuros estudios, con un mayor número de muestras tomadas a corto plazo, permitirá conocer como continúa comportándose la población del genotipo Sudamericano. A su vez, estos resultados evidencian claramente la importancia de tener un buen Plan de Saneamiento y Certificación de Cítricos, que trabaje acompasado con otras medidas de control de CTV.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En el presente estudio se implementa, por primera vez en Uruguay, un método de detección del genoma de CTV por RT-PCR en tiempo real con química TaqMan que constituye un herramienta rápida, confiable y precisa. Esta herramienta permitirá el procesamiento de un gran número de muestras lo que puede ser de gran utilidad tanto para los productores como para las entidades de vigilancia sanitaria.

También se presentó el primer estudio de caracterización molecular de las variantes genéticas que circulan en el país, en base al análisis de la secuencia completa de los genes p25, p20 y p23. Mediante este análisis detectamos la presencia de cuatro linajes co-circulantes con distinta prevalencia, tres de ellos previamente descritos (VT, T3 y T36) y el cuarto identificado en este trabajo, denominado linaje SA. Este último linaje está compuesto por aislados de Uruguay y Argentina. Estos resultados muestran que las cepas que circulan en nuestro país presentan una gran variabilidad genética, así como las que circulan en la región y el mundo.

Se detectó también la presencia de un aislado recombinante, procedente de un evento de recombinación entre los aislados T36 y NZ-M16. Sin embargo, algunas de las variantes de este aislado, también recombinantes, mostraron cierta divergencia respecto a la secuencia recombinante inicial.

Por último, mediante análisis de coalescencia, fuimos capaces de datar el ancestro común más reciente del linaje Sudamericano, así como también calcular la tasa de evolución del mismo. Se logró también modelar el comportamiento de la población de este linaje a lo largo de la historia, desde su origen al presente, identificando eventos que explican las fluctuaciones ocurridas por el tamaño de la población del virus en el tiempo.

Dentro de las actividades futuras respecto a esta línea de investigación nos planteamos:

- Realizar un muestreo de aproximadamente 1000 muestras, en todas las áreas citrícolas uruguayas con el fin de mapear la prevalencia y distribución de CTV en el país.
- Continuar con el diagnóstico y caracterización de CTV en muestras de campo.

- Continuar con la búsqueda de cepas del genotipo T30 de CTV con el fin de implementar un plan de protección cruzada.
- Realizar experimentos de atenuación de cepas, los cuales consisten en el pasaje de aislados severos de CTV por *Passiflora gracilis* o *P. caerulea* usando áfidos.
- Secuenciar el genoma completo de un aislado del linaje SA.

## 7. BIBLIOGRAFIA

Agranovsky AA. **1996**. Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers. *Adv Virus Res* 17:119-158.

Albiach-Marti MR, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf ME, Shanker S, Almira EC, Vives MC, Lopez C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey SM & Dawson WO. **2000a**. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *J Virol*. 74:6856-6865.

Albiach-Marti MR, Guerri J, Hermoso de Mendoza A, Laigret F, Ballester-Olmos JF & Moreno P. **2000b**. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology*. 90:134-138.

Ananthakrishnan G, Venkataprasanna T, Roy A & Brlansky RH. **2010**. Characterization of the mixture of genotypes of a *Citrus tristeza virus* isolate by reverse transcription-quantitative real-time PCR. *J Virol Methods*. 164:75-82.

Ayllon MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Mawassi M & Dawson WO. **1999**. New defective RNAs from citrus tristeza virus: evidence for a replicase driven template switching mechanism in their generation. *J Gen Virol*. 80:871-821.

Ayllon MA, Lopez C, Navas-Castillo J, Garnsey SM, Guerri J, Flores R & Moreno P. **2001**. Polymorphism of the 5' terminal region of *Citrus tristeza virus* (CTV) RNA: incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch Virol* 146:27-40.

Bar-Joseph M, Loebenstein G & Oren Y. **1974**. Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. En: *Proceedings of the 6<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Weathers LG, Cohen M, Eds). Berkeley, CA, USA: Univ Calif, Div Agr Sci, pp. 83-85.

Bar-Joseph M, Garnsey SM, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull DE, Clark MF & Loebenstein G. **1979**. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69:190-194.

Bar-Joseph M, Marcus R & Lee RF. **1989**. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annu Rev Phytopathol* 27:291-316.

Barbarossa L & Savino V. **2006**. Sensitive and specific digoxigenin-labelled RNA probes for routine detection of *Citrus tristeza virus* by dot-blot hybridization. *Phytopathology*. 154:329-335.

Batschelet E, Domingo E & Weissmann C. **1976**. The proportion of revertant and mutant phage in a growing population, as a function of mutation and growth rate. *Gene* 1:27-32.

Batuman O, Mawassi M & Bar-Joseph M. **2006**. Transgenes consisting of a dsRNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus* sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in citrus. *Virus Genes*. 33:319-327.

Baulcombe D. **2004**. RNA silencing in plants. *Nature*. 431(7006):356-63.

Bertalmío A, Maeso D, Sanguinetti G, Fontán G, De los Santos M, Borde J, Montes F, Colina R & Rivas F. **2012**. Saneamiento y Certificación de Cítricos. *Revista INIA*. 31:49-53.

Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, de Luis A, Vidal E, Pérez-Panadés & Cambra M. **2008**. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*. 120:177-188.

Biswas KK, Tarafdar A & Sharma SK. **2012**. Complete genome sequence of mandarine decline Citrus tristeza virus of the northeastern Himalaya hill region of India: comparative analyses determine recombinant. *Arch. Virol*. 157: 579-583.

Bové JM & Vogel R. **1981**. Description and illustration of virus and virus-like diseases of citrus. A collection of color slides. Paris, Francia: SETCO-IRFA.

Bové C, Vogel R, Albertini D & Bove JM. **1988**. Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. En: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 14-16.

Broadbent P, Bevington KB, Coote BG (1991) Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 64-70.

Brlansky RH, Damsteegt VD, Howd DS & Roy A. **2003**. Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Dis*. 87: 397-401.

Boyko VP, Karasev AV, Agranovsky AA, Koonin EV & Dolja VV. **1992**. Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9156-9160.

Cambra M, Camarasa E, Gorris MT, Garnsey SM & Carbonell E. **1991**. Comparison of different immunosorbent assays for *Citrus tristeza virus* (CTV) using CTV-specific monoclonal and polyclonal antibodies. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds)., Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 38-45.

Cambra M & Moreno P. **2000**. Tristeza En: *Enfermedades de los cítricos* (Duran-Vila N, Moreno P, Eds). Madrid: Ediciones Mundi-Prensa, pp. 77-81.

Cambra M, Gorris MT, Olmos A, Martínez MC, Roman, MP, Bertolini E, Lopez A & Carbonell EA. **2002**. European diagnostic protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. En: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila N, Milne RG, da Graca JV, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 69-77.

Carver M. **1978**. The black citrus aphids, *Toxotera citricidus* (Kirkaldy) and *T. aurantii* (Boyer de Fonscolombe) (Homoptera: Aphididae). *J of the Australian Entomological Society*. 17:263-270.

Cerni S, Skoric D, Ruscic J, Krajacic M, Papic T, Djelouah K & Nolasco G. **2009**. East Adriatic: a reservoir region of severe Citrus tristeza virus strains. *Eur J Plant Pathol*, 124:701–706.

Chandler LJ & Nordoff NG. **1999**. Identification of genetic variation among St. Louis encephalitis virus isolates, using single-strand conformation polymorphism analysis. *Journal of Virological Methods*. 80:169-178.

Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola. **1996**. Censo Nacional Citrícola. Montevideo: MGAP. 100p.

Costa AS & Grant TJ. **1951**. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. *Phytopathology*. 41:103-115.

Costa AS & Muller GW. **1980**. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Dis*. 64:538-541.

Covey SN, Alkaff NS, Langara A & Turner DS. **1997**. Plants combat infection by gene silencing. *Nature*. 385:781-782.

Davino S, Davino M, Sambade A, Guardo M & Caruso A. **2003**. The first *Citrus Tristeza Virus* outbreak found in a relevant citrus producing area of Sicily, Italy. *Plant Dis*. 87, 314. Dawson TE & Money PA. **2000**. Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of Citrus tristeza virus in New Zealand. In: Da Graça, JV; Lee, RF; Yokomi, RK (eds.). Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, pp 69-76.

Davino S, Willemsen A, Panno S, Davino M, Catara A, Elena S & Rubio L. **2013**. Emergence and Phylodynamics of Citrus Tristeza Virus in Sicily, Italy. *PLoS ONE* 8(6): e66700. doi:10.1371/journal.pone.0066700

Dixon AFG. **1998**. Aphid Ecology, 2<sup>nd</sup> ed. Chapman & Hall, London. 300 pp.

Dodds JA & Lee JG. **1991**. An evaluation of types of citrus tristeza virus in selected sweet orange groves in Southern California. En: *Proceedings of the 10<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Navarro L, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 103-112.

Dolja VV, Karasev AV & Koonin EV. **1994**. Molecular Biology and Evolution of Closteroviruses: Sophisticated Build-up of Large RNA Genomes. *Annu Rev Phytopathol* 32: 261-285.

Dolja VV, Kreuze JF & Valkonen JPT. **2006**. Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Research* 117: 38-51.

Domingo E, Sabo D, Taniguchi T & Weissman C. **1978**. Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell*. 13:735-744.

Domingo E, Biebricher C & Eigen M. **2001**. Quasispecies and RNA Virus Evolution: Principles and Consequences. *Austin: Landes Bioscience*.

Domingo E. ed. **2006**. Quasispecies: concepts and implications for virology. *Current Topics in Microbiology and Immunology*.

Domingo E & Gómez J. **2007**. Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Research*. 127: 131-150.

Drake J & Holland J. **1999**. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:13910-13913.

D' Urso F, Ayllon MA, Rubio L, Sambade A, Hermoso-de-Mendoza A, Guerri J & Moreno P. **2000**. Contribution of uneven distribution of genomic RNA variants of citrus tristeza virus (CTV) within the plant to changes in the viral population following aphid transmission. *Plant Pathology* 49:288-294.

Duran-Vila N & Moreno P. **2000**. Enfermedades de los cítricos., Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa, 165 pp.

EPPO. **2014**. PQR- EPPO database on quarantine pests. <http://www.eppo.int>

Fagoaga C, López C, Moreno P, Navarro L, Flores R & Peña L. **2005**. Viral-Like Symptoms Induced by the Ectopic Expression of the *p23* Gene of *Citrus tristeza virus* Are Citrus Specific and Do Not Correlate with the Pathogenicity of the Virus Strain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 18:435-445.

FAO. **2013**. Libro Anual Estadístico. [www.fao.org](http://www.fao.org)

Francis M, Peyrou M, Perea B, Borde J & Fosali YA. **1997**. Caracterización de aislamientos del virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) que causan pérdidas en pomelo injertado sobre *Trifolia* en Uruguay. En: IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología.10/97. Montevideo, Uruguay.

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

Fraser L. **1952**. Seedling yellows, an unreported virus disease of citrus. *Agricultural Gazette of New South Wales* 63: 125-131.

Folimonova SY, Folimonov A, Satyanarayana T & Dawson WO. **2008**. *Citrus Tristeza Virus*: Survival at the edge of the movement continuum. *J Virol*. 82(13):6546-6556.

Folimonova SY, Robertson CJ, Shilts T, Folimonov AS, Hilf ME, Garnsey SM & Dawson WO. **2010**. Infection with Strains of *Citrus Tristeza Virus* Does Not Exclude Superinfection by Other Strains of the Virus. *Journal of Virology*. 84:1314-1325.

Folimonova SY. **2012**. Superinfection exclusion is an active virus-controlled function that requires a specific viral protein. *J Virol*. 86(10):5554-5561.

Folimonova SY. **2013**. Developing an understanding of cross-protection by *Citrus tristeza virus*. *Frontiers in Microbiology*. 4(75):1-9.

Gallie DR & Kobayashi M. **1994**. The role of the 3'-untranslated region of non-polyadenylated plant viral mRNAs in regulating translational efficiency. *Gene*. 142(2):159-65.

Gal-On A & Shibolet Y. **2005**. Cross-protection. Natural resistance mechanisms of plants to viruses. In G. Loebenstein and J.P. Carr (ed.), Springer, Dordrecht, The Netherlands. p. 261-288.

Garcia-Arenal F, Fraile A & Malpica JM. **2001**. Variability and Genetic Structure of Plant Virus Populations. *Annual Reviews in Phytopathology*. 39:157-186.

Garnsey SM, Civerolo EL, Lee RF, Yokomi RK & Behe CC. **1995**. Using the Beltsville international CTV collection facility to determine severity of Caribbean isolates of citrus tristeza virus. En: *Proceedings of the 3rd International Workshop on Citrus Tristeza Virus and the Brown Citrus Aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies* (Lee RF, Rocha-Pena M, Niblett CL, Ochoa F, Eds). Lake Alfred, FL, USA: FAO, University of Florida, USDA-OICD, pp. 253-259.

Garnsey SM, Gottwald TR & Yokomi RK. **1998**. Control strategies for citrus tristeza virus. In: *Plant virus disease control* (Hadidi A, Khetarpal R, Koganezawa H, Eds). St. Paul, MN, USA: APS Press, pp. 639-658.

Garnsey SM, Gottwald TR, Hilf ME, Matos L & Borbón J. **2000**. Emergence and spread of severe strains of *Citrus Tristeza Virus* isolates in the Dominican Republic. In: *proceedings of the 14<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graça JV, Lee RF & Yokomi RK eds), Riverside, CA: IOCV. pp. 57-68.

Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R & Peña L. **2001**. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular Plant Pathology*. 2:27-36.

Gmyl A, Korshenko S. & Belousov E. **2003**. Nonreplicative homologous RNA recombination: promiscuous joining of RNA pieces? *RNA* 9:1221-1231.

Gomes CP, Nagata T, de Jesus WC Jr, Neto CR, Pappas GJ Jr & Martin DP. **2008**. Genetic variation and recombination of RdRp and HSP 70h genes of Citrus Tristeza Virus isolates from orange trees showing symptoms of citrus sudden death disease. *Viol. J.* 16: 5-9. Gonsalves D, Purcifull DE & Garnsey SM. **1978**. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68:553-559.

Gottwald TR, Cambra M, Moreno P, Camarasa E & Piquer J. **1996**. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in Eastern Spain. *Phytopathology*. 86, 45-55.

Gottwald TR, Garnsey SM & Borbón J. **1998**. Increase and patterns of spread of Citrus Tristeza Virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the Brown Citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology*. 88(7):621-36. doi: 10.1094/PHYTO.1998.88.7.621.

Gottwald TR, Sun X, Riley T, Graham JH, Ferrandino F & Taylor EL. **2002**. Geo-referenced spatiotemporal analysis of the urban citrus canker epidemic in Florida. *Phytopathology*. 92(4):361-77. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.4.361.

Grant TJ & Costa AS. **1951**. A mild strain of the tristeza virus of citrus. *Phytopathology* 41:114-122.

Gray S & Banerjee N. **1999**. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microb. and Mol. Biology Reviews* 63 (1):128-148.

Guindon S & Gascuel O. **2003**. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696-704.

Gutierrez C. **2009**. The Arabidopsis cell division cycle. *Arabidopsis Book*. doi: 10.1199/tab.0120. Epub 2009 Mar 20.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D & Hannon GJ. **2000**. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404:293-296.

Harper SJ, Dawson TE & Pearson MN. **2009**. Complete genome sequences of two distinct and diverse *Citrus tristeza virus* isolates from New Zealand. *Arch. Virol.* 154: 1505-1510.

Harper SJ, Dawson TE & Pearson MN. **2010**. Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Arch. Virol.* 155: 471-480.

Harper SJ. **2013**. *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*. 4(93):1-18.

Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos JF & Pina JA. **1984**. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, *Aphididae*) in Spain. En: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 23-27.

Hilf ME, Karasev AV, Albiach-Marti MR, Dawson WO & Garnsey SM. **1999**. Two paths of sequence divergence in the *Citrus tristeza virus* complex. *Phytopathology* 89:336-342.

Hilf ME, Mavrodieva VA & Garnsey SM. **2005**. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95:909-917.

Hilf ME. **2010**. The tail that wags the virus: recombination defines two gene modules and provides for increased genetic diversity in a narrow-host-range plant virus. In: *Citrus Tristeza Virus Complex and Tristeza Diseases*. Karasev AV & Hilf ME eds. (St. Paul, MN: APS Press), 73-93.

Ieki, H. **1992**. (Comunicación personal con Bertalmío, A. INIA-Salto Grande).

Iglesias NG, Gago-Zachert SP, Robledo G, Costa N, Plata MI, Vera O, Grau O & Semorile LC. **2008**. Population structure of *Citrus tristeza virus* from field Argentinean isolates. *Virus Genes* 36:199–207.

Ilharco FA, Sousa-Silva CR & Alvarez-Alvarez A. **2005**. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agron Lusit* 51: 19-21.

Jiang B, Hong N, Wang GP, Hu J, Zhang JK, Wang CX, Liu Y & Fan JD. **2008**. Characterization of Citrus tristeza virus strains from southern China based on analysis of restriction patterns and sequences of their coat protein genes. *Virus Genes*. 37(2):185-92.

Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D & Barrios M. **2000**. Detection of Genetic Diversity Among Bovine Immunodeficiency Virus Populations by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis. *Viral Immunology*. 13:373-381.

Karasev AV, Chirkov SN, Kaftanova AS, Miroshnichenko NA, Surgucheva NA & Fedotina VL. **1989**. Characterization of bean mild mosaic virus : particle morphology, composition and RNA cell-free translation. *Intervirology*. 30(5):285-93.

Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowski DJ & Dawson WO. **1995**. Complete Sequence of the Citrus Tristeza Virus RNA Genome. *Virology*. 208:511-520.

Koch de Brotos L. & Boasso C. **1955**. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Ministerio de Ganadería y Agricultura. Dirección de Agronomía. Laboratorio de Fisiología y Patología Vegetal. Publicación Nº 106. 65p.

Koizumi M. **1991**. Citrus tristeza virus field isolates from declined of dwarfed citrus trees in Japan. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp 25-30.

Kyriakou A, Ioannou N, Gavriel J, Bar-Joseph M, Papayiannis C, Kapar-Isaia T & Savva G. **1996**. Management of citrus tristeza virus in Cyprus. En: *Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (da Graca JV, Moreno P, Yokomi RK, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 172-178.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW & Ray SC. **1999**. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*. 73(1):152-60.

López C, Ayllon MA, Navas-Castillo J, Guerri J, Moreno P & Flores R. **1998**. Sequence polymorphism in the 5' and 3' terminal regions of citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* 88:685–691.

López C, Navas-Castillo J, Gowda S, Moreno P & Flores R. **2000**. The 23-kDa Protein Coded by the 3'-Terminal Gene of Citrus Tristeza Virus Is an RNA-Binding Protein. *Virology*. 269:462-470.

Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Wan-Xiang L, Falk BW, Dawson WO & Ding S. **2004**. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:15742-15747.

Maeso D & Bertalmío A. **2002**. Programa INIA de Producción de materiales Cítricos con Sanidad Controlada 1990-2001. Seminario interno INIA Las Brujas.

Mamán S, Fossali A, Rey F & Francis M. **1996**. Comparación de técnicas inmunoenzimáticas para la detección del virus de la Tristeza de los Citrus. En: VIII Congreso Latinoamericano, VI Nacional de Horticultura. 9-12/12/1996. Montevideo-Uruguay.

Martin S, Sambade A, Rubio L, Vives MC, Moya P, Guerri J, Elena SF & Moreno P. **2009**. Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Virology*. 90:1527-1538.

Mawassi M, Mietkiewska E, Gofman R, Yang G & Bar-Joseph JM. **1996**. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus tristeza virus*. *J Gen Virol* 77:2359-2364.

McClellan APD. **1957**. Tristeza virus of citrus: evidence for absence of seed transmission. *Plant Dis Repr* 41: 821.

McClellan, APD. **1963**. The tristeza complex: Its variability in field-grown citrus in South Africa. *S Afr J Agric Sci* 6: 303-332.

McClellan APD. **1975**. Tristeza virus complex: its transmission by aphid *Toxoptera citricidus*. *Phytophylactica* 7: 109-113.

Medina V, Peremyslov VV, Hagiwara Y & Dolja VV. **1999**. Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. *Virology*. 260(1):173-81.

Melzer MJ, Borth WB, Sether DM, Ferreira S, Gonsalves D & Hu JS. **2010**. Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes*. 40:111-118.

MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca) **1981**. Enfermedades en plantas hongos superiores y saprofitas en Uruguay. Montevideo: MGAP. Informe técnico N°9.140p.

MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca)- DIEA. **2011**. Encuesta Citrícola Primavera 2010. Enc. N° 299.

Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J & Peña L. **2008**. Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol* 9:251-268.

Muller GW & Costa AS. **1987**. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* 19:197-198

Nagy PD & Simon AE. **1997**. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235:1-9

Navarro L. **1993**. Citrus sanitation, quarantine and certification programs. En: *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Moreno P, da Graca JV, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 383-391.

Navarro L, Pina JA, Juarez J, Ballester-Olmos JF, Duran-Vila N, Guerri J, Moreno P, Cambra M, Zaragoza S & Medina A. **2002**. The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2001. En: *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila N, Milne RG, da Graca JV, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV, pp. 306-316.

Narvaez G, Skander BS, Ayllon MA, Rubio L, Guerri J & Moreno P. **2000**. A new procedure to differentiate *Citrus tristeza virus* isolates by hybridization with digoxigenin labelled cDNA probes. *J Virol Methods* 85:83-92.

Nolasco G, de Blas C, Torres V & Ponz F. **1993**. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the detection of plant viruses and subviral pathogens. *J Virol Methods* 45:201-218.

Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris MT & Terrada E. **1999**. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Res* 27:1564-1565.

Palacio A & Duran-Vila N. **1999**. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterization. *Journal of Virological Methods*. 77:27-36.

Pappu HR, Manjunath KL, Lee RF & Niblett CL. **1993**. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3641-3644.

Pappu HR, Karasev AV, Anderson EJ, Pappu SS, Hilf ME, Febres VJ, Eckloff MRG, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja VV, Koonin EV, Gumpf DJ, Cline KC, Garnsey SM, Dawson WO, Lee RF & Niblett CL. **1994**. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199: 35-46.

Peremyslov VV, Pan YW & Dolja VV. **2004**. Movement protein of a closterovirus is a type III integral transmembrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Virol* 78:3704-3709.

Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ & Lee RF. **1990**. A monoclonal antibody which discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 80:224-228.

Posada D. **2008**. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol*. 25(7):1253-1256.

Rai M. **2006**. Refinement of the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*Ctv*) positional map in *Poncirus trifoliata* and generation of transgenic grapefruit (*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol Biol* 61:399-414.

Rao ALN. **2006**. Genome packaging by spherical plant RNA viruses. *Ann Rev Phytopathology*. 44:61-87.

Ratcliff F, Harrison BD & Baulcombe DC. **1997**. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276:1558-1560.

Ratcliff F, MacFarlane S & Baulcombe DC. **1999**. Gene silencing without DNA. RNA mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* 11:1207-1216.

Rocha-Peña MA, Lee RF, Lastra R, Niblett CL, Ochoa-Corona FM, Garnsey SM & Yokomi RK. **1995**. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant. Dis.* 79:437-443.

Roistacher CN. **1981**. A blueprint for disaster: The history of seedling yellows disease. *Citrograph.* 67, 4-24.

Roistacher CN. **1988**. Observations on the decline of sweet orange trees in coastal Peru caused by stem-pitting tristeza. *Pl. Prot. Bull., India* 36: 19-26.

Roistacher CN & Moreno P. **1991**. The worldwide threat from destructive isolates of *Citrus tristeza virus*. En: *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp.7-19.

Roistacher CN, da Graça JV & Müller GW. **2010**. Cross Protection Against *Citrus Tristeza Virus* a Review. En: *Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 1-27.

Rosner A & Bar-Joseph M. **1984**. Diversity of citrus tristeza virus strains indicated by hybridization with cloned cDNA sequences. *Virology* 139:189-193.

Roy A & Brlansky RH. **2009**. Population dynamics of a Florida Citrus Tristeza Virus isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology.* 99(11):1297-1306. doi: 10.1094/PHYTO-99-11-1297.

Roy A & Brlansky RH. **2010**. Genome Analysis of an Orange Stem Pitting *Citrus Tristeza Virus* Isolate Reveals a Novel Recombinant Genotype. *Virus Research.* 151:118-130.

Roy A, Manjunath KL & Brlansky RH. **2005**. Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of *Citrus tristeza virus* from India. *Virus Research.* 113:132-142.

Roy A, Ananthakrishnan G, Hartung JS & Brlansky RH. 2010. Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology.* 100(10):1077-88.

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

Rubio L, Ayllon MA, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P & Falk BW., **2001**. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75:8054-8062.

Ruiz-Ruiz, S. **2009**. El virus de la Tristeza de los cítricos (CTV): Desarrollo y aplicación de herramientas para establecer un sistema genético eficaz. Tesis Doctoral.

Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J & Ambrós S. **2009**. Discrimination Between Mild and Severe *Citrus tristeza virus* Isolates with a Rapid and Highly Specific Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Method Using TaqMan LNA Probes. *Phytopathology*, 99(3):307-315.

Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Hornsell T, Rice P, Rajandream MA & Barrell B. **2000**. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 16(10):944-5. PUBMED: 11120685.

Sambade A, Lopez C, Rubio L, Flores R, Guerri J & Moreno P. **2003**. Polymorphism of a specific region in gene p23 of *Citrus tristeza virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* 148:2325-2340.

Sambade A, Ambros S, Lopez C, Ruiz-Ruiz S, de Mendoza AH, Flores R Guerri J & Moreno P. **2007**. Preferential accumulation of severe variants of Citrus tristeza virus in plants co-inoculated with mild and severe variants. *Arch Virol* 152:1115-1126.

Saponari M, Manjunath K & Yokomi RK. **2008**. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan (R)). *J Virol Methods* 147:43-53.

Satyanarayana T, Gowda S, Mawassi M, Albiach-Martí MR, Ayllón MA, Robertson C, Garnsey SM & Dawson WO. **2000**. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* 278:253–265.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR & Dawson WO. **2002a**. Mutational analysis of the replication signals in the 3'-non translated region of *Citrus tristeza virus*. *Virology* **300**:140-152.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA, Albiach-Marti MR, Rabindram R & Dawson WO. **2002b**. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol* 76:473-483.

Satyanarayana T, Gowda S, Ayllon MA & Dawson WO. **2004**. Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:799-804.

Schneider H. **1959**. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. In: *Citrus Virus Diseases* (Wallace JM ed), pp. 73-84. Berkeley, CA: University of California Division of Agricultural Sciences.

Schneider WL & Roossinck ML. **2001**. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interaction. *J of Virology*. 75:6566-6571.

Shi N, Chen J, Wilson TMA, Macfarlane SA, Antoniw JF & Adams MJ. **1996**. Single-strand conformation polymorphism analysis of RT-PCR products of UK isolates of barley yellow mosaic virus. *Virus Research*. 44:1-9.

Silva G, Marques N & Nolasco G. **2012**. The evolutionary rate of citrus tristeza virus ranks among the rates of the slowest RNA viruses. *J Gen Virol*. 93:419-429.

Suastika G, Natsuaki T, Terui H, Kano T, Ieki H & Okuda S. **2001**. Nucleotide sequence of citrus tristeza virus seedling yellows isolate. *J Gen Plant Pathol* 67:73-77.

Sztuba-Solinska J, Urbanowicz A, Figlerowicz M & Bujarski JJ. **2011**. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annu Rv Phytopathology*. 49:415-43. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095351.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A & Kumar S. **2013**. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30:2725-2729.

Tatineni S, Robertson CJ, Garnsey SM, Bar-Joseph M, Gowda S & Dawson WO. **2008**. Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology*. 376:297-307.

Tatieni S, Robertson CJ, Garnsey SM & Dawson WO. **2011**. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108(42):17366-71. doi: 10.1073/pnas.1113227108.

Timmer LW, Garnsey SM & Graham JH. **2000**. *Compendium of Citrus Diseases*. St Paul, MN: APS Press.

Vela C, Cambra M, Cortes E, Moreno P, Miguët JG, Perez de San Roman C & Sanz A. **1986**. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *J Gen Virol* 67:91-96.

Vives MC, Rubio L, López C, Navas-Castillo J, Albiach-Marti MR, Dawson WO, Guerri J, Flores R & Moreno P. **1999**. The complete genome sequence of the major components of a mild citrus tristeza virus isolate. *Journal of General Virology*. 80:811-816.

Vives MC, Rubio L, Sambade A, Mirkov TE, Moreno P & Guerri J. **2005**. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequence variants within a Citrus Tristeza Virus isolate. *Virology*. 331(2):232-7.

Wallace JM, Oberholzer PCJ & Hofmeyer JDJ. **1956**. Distribution of viruses of tristeza and other propagative material. *Plant Dis Reprtr*. 40:3-10.

Weng Z, Barthelson R, Gowda S, Hilf ME, Dawson WO, Galbraith DW & Xiong Z. **2007**. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS One*. 2(9):e917.

Xu WX, Hong N, Zhang JK & Wang GP. **2006**. Improving the sensitivity of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to study the variability of PLMVd. *Journal of Virological Methods*. 135:276-28.

Yang ZN, Mathews DM, Dodds JA & Mirkov TE. **1999**. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19:131-142.

Yang ZN, Ye XR, Choi S, Molina J, Moonan F, Wing RA, Roose ML & Mirkov TE. **2001**. Construction of a 1.2-Mb contig including the citrus tristeza virus resistance gene locus using a bacterial artificial chromosome library of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Genome* 44:382-393.

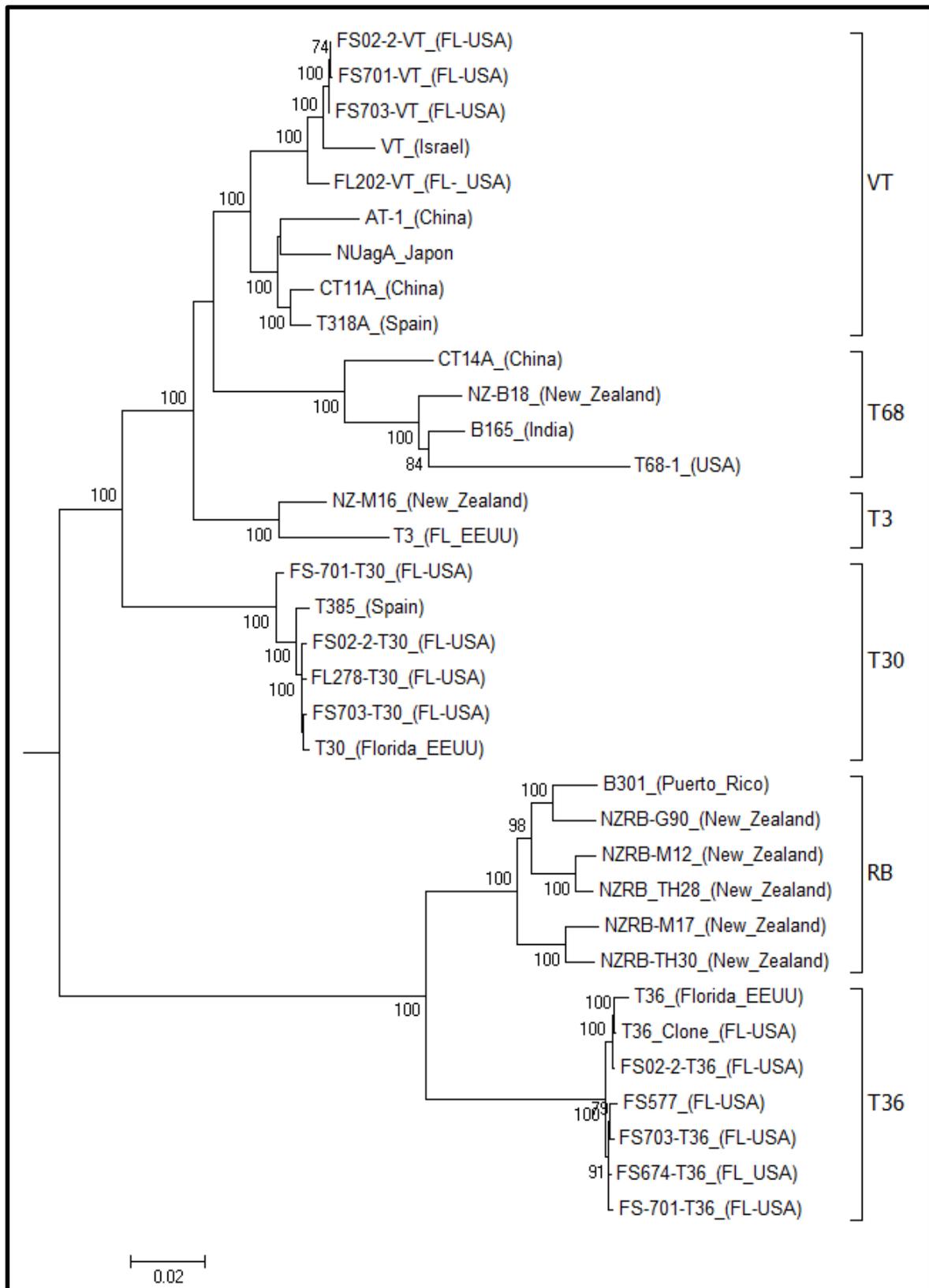
Yang ZN, Ye XR, Molina J, Roose ML & Mirkov TE. **2003**. Sequence analysis of a 282-kilobase region surrounding the *Citrus tristeza virus* resistance gene (*ctv*) locus in *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Plant Physiol* 131:482-492.

Yoon JY, Ahn HI, Kim M, Tsuda S & Ryu KI. **2006**. *Pepper mild mottle virus* pathogenicity determinants and cross protection effect of attenuated mutants in pepper. *Virus Research*. 118:23-30.

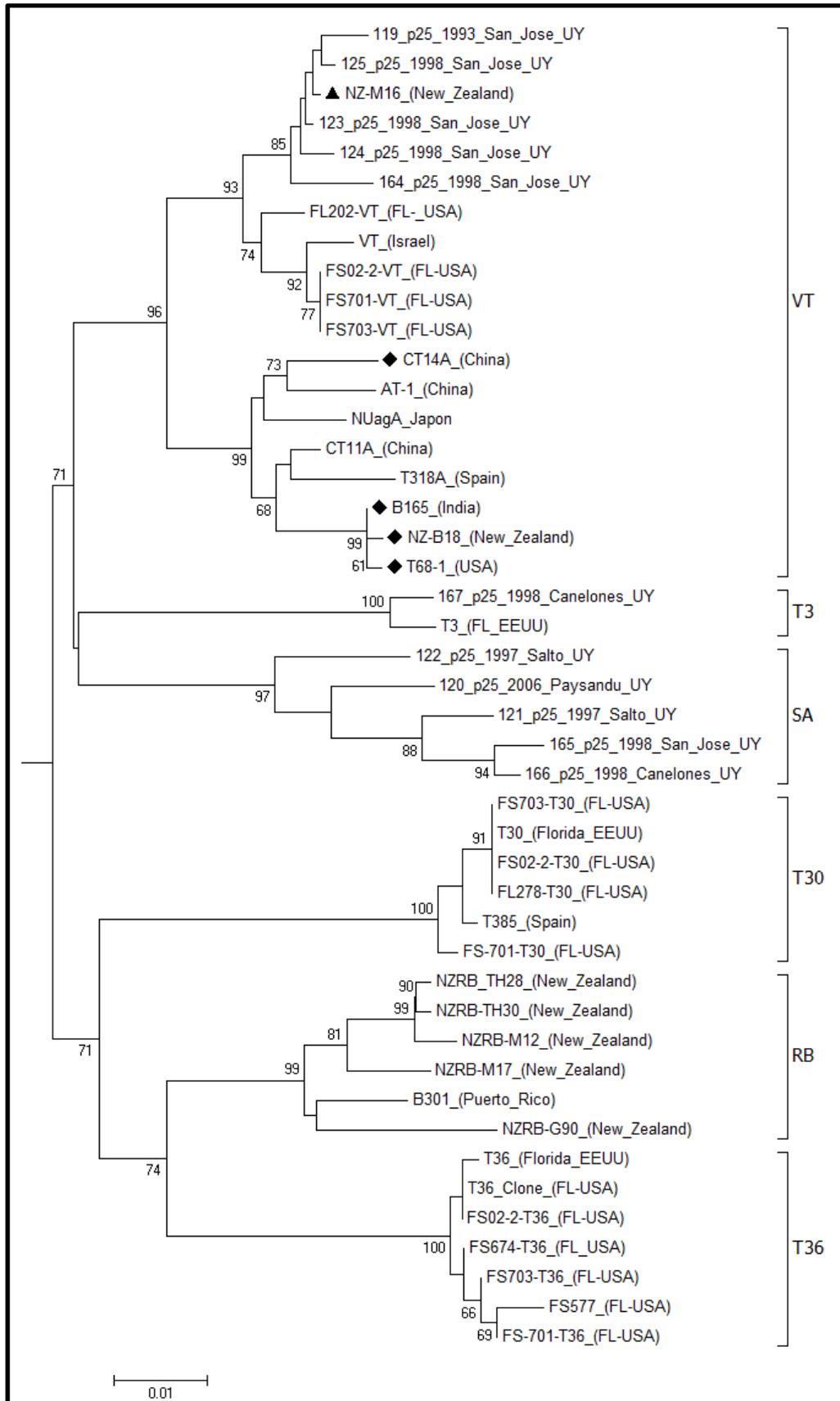
Yokomi RK, Lastra R, Stoetzel MB, Lee RF, Garnsey SM, Gottwald TR, Rocha-Peña MA & Niblett. CL. **1994**. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 1078-1085.

Zaragoza S. 2007. Aproximación a la historia de los cítricos. Orígen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.

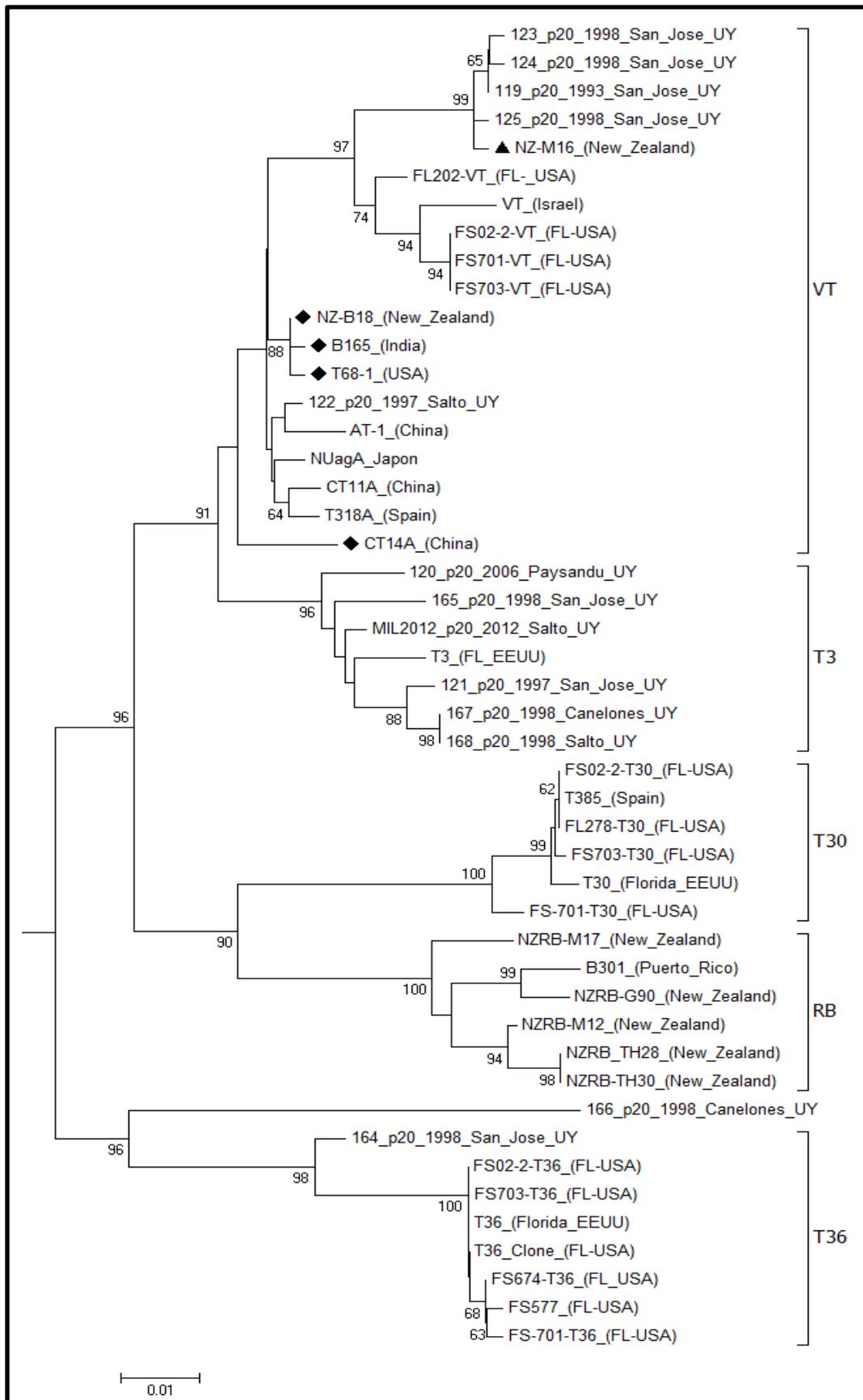
## 8. ANEXO



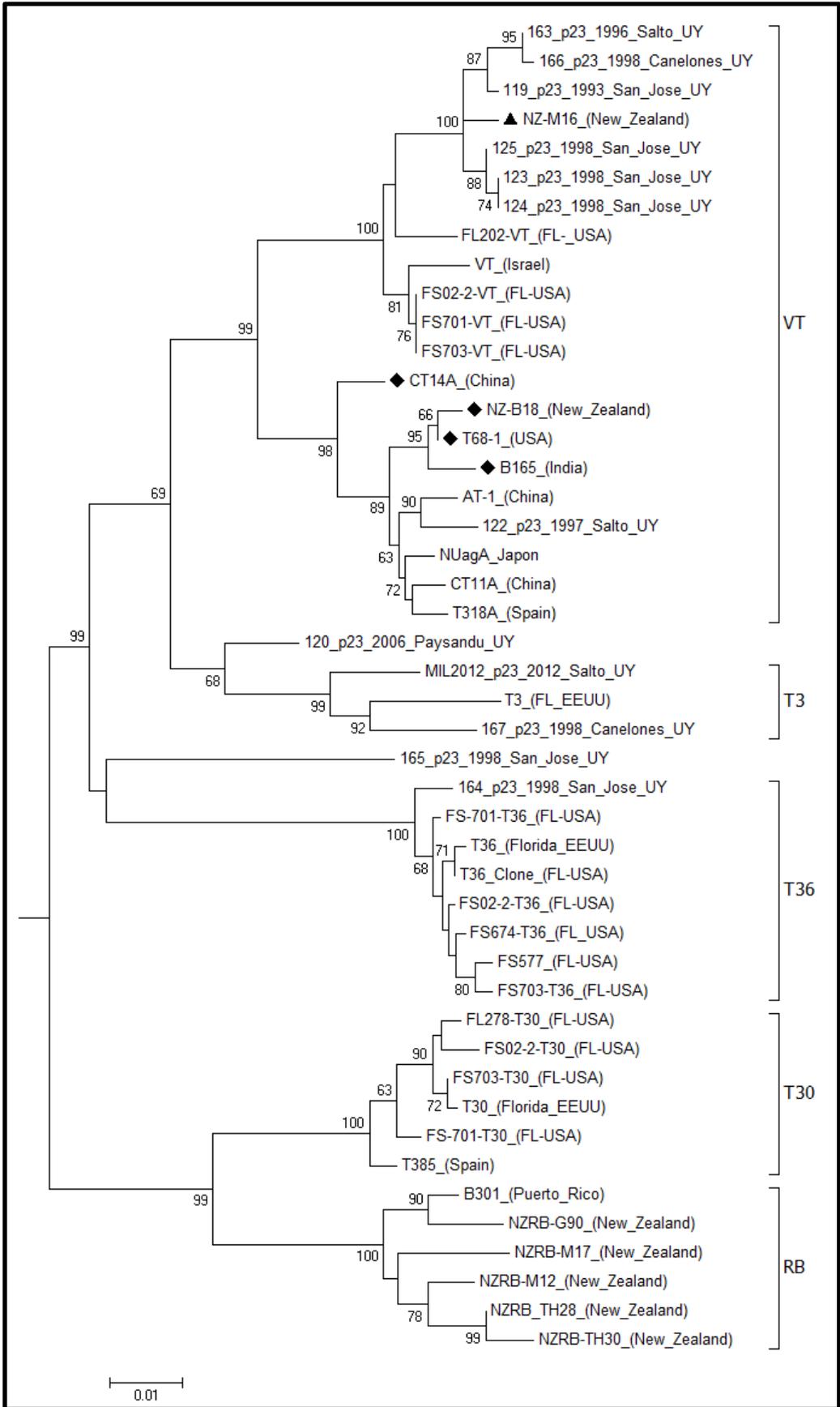
**Figura A.1.** Árbol filogenético construido con los genomas completos de las secuencias de referencia utilizadas por Harper (2013) mediante el método de Neighbor Joining. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y un total de 1000 pseudoréplicas.



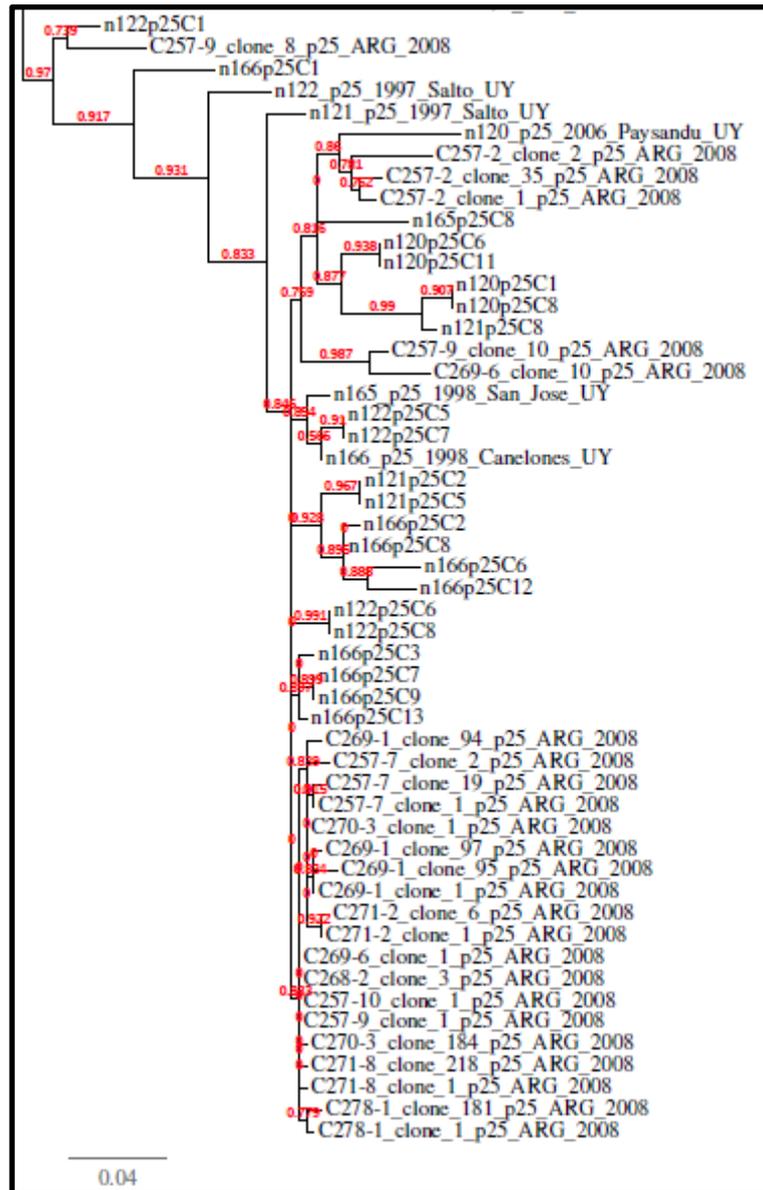
**Figura A.2.** Árbol filogenético construido con la secuencia del gen p25 de las secuencias de referencia utilizadas por Harper (2013) mediante el método de Neighbor Joining. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y un total de 1000 pseudoréplicas. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (♦) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).



**Figura A.3.** Árbol filogenético construido con la secuencia del gen p20 de las secuencias de referencia utilizadas por Harper (2013) mediante el método de Neighbor Joining. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y un total de 1000 pseudoréplicas. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (◆) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).



**Figura A.4.** Árbol filogenético construido con la secuencia del gen p23 de las secuencias de referencia utilizadas por Harper (2013) mediante el método de Neighbor Joining. Se utilizó el modelo Kimura 2 parámetros y un total de 1000 pseudoréplicas. Se indican los aislados del genotipo T68 con un rombo (♦) y el aislado NZ-M16 con un triángulo (▲).



**Figura A.5.** Sección del árbol filogenético construido mediante el método de Máxima Verosimilitud, donde se muestran las secuencias del clado SA para el gen p25 utilizadas para el análisis de coalescencia. En rojo se muestran los valores de aLRT.