

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLAMIENTOS
DE CAMPO DE CTV**

por

Leticia RUBIO CATTANI

TESIS presentada como uno de los
requisitos para obtener el título de
Magíster en Ciencias Agrarias, opción
Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO
URUGUAY
Abril de 2016

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Ing. Agr. (MSc) Vivienne Gepp, la Ing. Agr. (MSc) Mercedes Peyrou y el Ing. Agr. (MSc) Alfredo Gravina, el 12 de abril de 2016. Autor: Ing. Agr. Leticia Rubio. Directores: Ing. Agr. (MSc) Diego Maeso y Dr. Rodney Colina.

AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Agr. Diego Maeso, por la dirección del trabajo, correcciones y enseñanzas.

A la Ing. Agr. Ana Bertalmío y al asistente Roque Rolón, por enseñarme todo lo referente a los testajes biológicos y acompañarme en cada lectura de síntomas y a Ana por sus sugerencias, correcciones y aporte de material bibliográfico.

Al Ing. Agr. Fernando Rivas, quien avaló y apoyó desde el Programa de Citricultura esta línea de trabajo.

Al Dr. Rodney Colina y la Lic. María José Benítez, quienes me orientaron en las técnicas moleculares y en el análisis de las mismas.

A la Lic. Ana Arruabarrena, por permitirme trabajar en su laboratorio, por su disposición para enseñarme, por atender siempre mis dudas y errores y tratar de solucionar aquellas cosas que no salían bien.

A los compañeros de protección vegetal de Inia Salto Grande: Juan Nuñez, Juan Amaral, Andrea Guimaraens y Oribe Blanco por su colaboración en las diferentes etapas del trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
SUMMARY.....	VIII
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 EL CULTIVO DE CÍTRICOS.....	2
1.2 LIMITANTES PRODUCTIVAS DEL CULTIVO DE CÍTRICOS.....	3
1.3 LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS.....	4
1.3.1 <u>Síntomas</u>	6
1.3.2 <u>Agente causal: <i>Citrus tristeza virus</i></u>	10
1.3.2.1 Características genómicas.....	10
1.3.2.2 Diversidad genética de aislados.	11
1.3.3 <u>Principales hospederos</u>	14
1.3.4 <u>Epidemiología</u>	14
1.3.4.1 Transmisión por injerto.....	15
1.3.4.2 Transmisión por pulgones	15
1.3.4.3 Patrón de distribución espacio-temporal de CTV... ..	17
1.3.5 <u>Diagnóstico de CTV</u>	17
1.3.5.1 Testajes biológicos.....	18
1.3.5.2 Microscopía óptica.....	18
1.3.5.3 Métodos serológicos	18
1.3.5.4 Métodos moleculares.....	19
1.3.6 <u>Caracterización de aislados de CTV</u>	21
1.3.6.1 Testajes biológicos.....	21
1.3.6.2 Métodos serológicos.....	23
1.3.6.3 Métodos moleculares.....	24

1.3.7 <u>Estrategias de control</u>	29
1.3.7.1 Control por cuarentena y exclusión	29
1.3.7.2 Programas de saneamiento y certificación.....,	29
1.3.7.3 Utilización de portainjertos resistentes	30
1.3.7.4 Protección cruzada	30
1.3.7.5 Resistencia genética	32
1.4 SITUACIÓN DE CTV EN URUGUAY.....	32
1.4.1 <u>El cultivo de cítricos en Uruguay</u>	32
1.4.2 <u>El virus de la Tristeza en Uruguay</u>	33
1.5. OBJETIVOS.....	35
1.5.1 <u>Objetivo general</u>	35
1.5.2 <u>Objetivos específicos</u>	35
2. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	36
2.1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS DE CTV.....	36
2.1.1 <u>Aislados</u>	36
2.1.2 <u>Bioensayos</u>	37
2.1.3 <u>Análisis de datos</u>	40
2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE CTV.....	40
2.2.1 <u>Extracción de RNA viral</u>	40
2.2.2 <u>Síntesis de cDNA</u>	41
2.2.3 <u>RT-PCR</u>	41
2.2.4 <u>Purificación de los productos de PCR</u>	43
2.2.5 <u>Secuenciación</u>	43
2.2.6 <u>Alineamientos de secuencias</u>	43
2.2.7 <u>Análisis filogenéticos</u>	44
3. <u>RESULTADOS</u>	45
3.1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	45
3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	53
4. <u>DISCUSIÓN</u>	61
5. <u>CONCLUSIONES</u>	66
6. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	67

7. ANEXO: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
AISLADOS DE CAMPO DE CTV.....83

RESUMEN

Citrus tristeza virus (CTV) es el agente causal de una de las enfermedades virales más importantes de los cítricos. En nuestro país, a pesar del uso de portainjertos resistentes, se han reportado síntomas que afectan el potencial productivo de las plantas. Aunque, este patógeno es eliminado durante la etapa de saneamiento, la presencia endémica del virus y el vector determinan un alto riesgo de infección en campo con aislados severos. Una solución a este problema podría ser la inoculación de plantas saneadas con aislamientos “suaves” de CTV, medida que se conoce con el nombre de “protección cruzada”. Para implementar este mecanismo en nuestras condiciones es necesario caracterizar los aislamientos locales. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la severidad de 20 aislamientos locales mediante bioensayos y métodos moleculares. Los bioensayos se realizaron en un invernadero con condiciones controladas, donde cada aislamiento fue inoculado en 5 especies indicadoras: lima mexicana, naranja dulce, naranja agrio, pomelo Duncan y naranja dulce/naranja agrio. Se evaluó la presencia y severidad de los síntomas generados por cada aislado. La caracterización molecular se realizó mediante la técnica de amplificación por RT-PCR, utilizando el método “primer específico” para los genes P25, P20 y P23. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con cepas de referencia internacional y se construyeron árboles filogenéticos. Los resultados obtenidos en los bioensayos demuestran el predominio de cepas severas de CTV, capaces de producir acanaladuras en la madera, enanismo, síndrome del plantín amarillo, entre otros. La población viral a nivel genético es diversa y los genotipos obtenidos, en general, están asociados con aislados severos de referencia internacional. Estos resultados refuerzan la necesidad de implementar un programa de protección cruzada, aunque, también complejizan la obtención de aislados promisorios.

Palabras claves: CTV, aislados, protección cruzada, severidad.

BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF FIELD ISOLATES OF CTV

SUMMARY

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of one of the most important viral diseases of citrus. In our country, despite the use of resistant rootstocks, symptoms that affect the productive potential of plants have been reported. Although this pathogen is effectively eliminated by sanitation, endemic presence of this virus and its vector represents a high infection risk with severe isolates. "Cross-protection", the inoculation of virus-free plants with "mild" CTV isolates, could contribute to solve this problem. First, it is necessary to know the composition of local CTV isolates to implement it. The aim of this study was to determine the severity of 20 local CTV isolates using bioassays and molecular methods. Bioassays were conducted in a greenhouse with controlled conditions, where each isolate was inoculated on 5 indicator species: mexican lime, sweet orange, sour orange, Duncan grapefruit and sweet orange / sour orange. Presence and severity of symptoms generated by each isolate was evaluated. Molecular characterization was carried out by RT-PCR amplification, using P25, P20 and P23 genes specific primers. The nucleotide sequences obtained were aligned with international reference strains and phylogenetic trees were constructed. Bioassays revealed the prevalence of severe CTV strains producing stem pitting, stunting and seedling yellow, among others. Viral population was genetically diverse and the genotypes obtained were generally associated with severe isolates according to international references. These results reinforce the need to implement a cross-protection program, but also complicate obtaining promising isolated.

Keywords: CTV, isolate, cross-protection, severity.

1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos son el rubro de mayor importancia dentro del área hortifrutícola del país, con una producción de 300 mil toneladas al año de las cuales la mitad se exporta (DIEA, 2014), siendo proveedor en "contra-estación" fundamentalmente para la Unión Europea. Como rubro exportador, la cadena citrícola es demandante en tecnologías y medidas de manejo que incrementen su producción en términos de volumen y calidad, siendo los problemas sanitarios una de sus principales limitantes productivas. El virus de la Tristeza ha sido una de las enfermedades más devastadoras de este cultivo, destruyendo millones de plantas en todo el mundo. En nuestro país, la Tristeza, es una enfermedad endémica y está presente su vector más eficiente *Toxoptera citricida* (Bentancour et al., 2009), sin embargo, no es considerada una enfermedad limitante ya que el 90% de la citricultura utiliza portainjertos resistentes (*Poncirus trifoliata* o sus híbridos: Citrange, Carrizo y Troyer) al declinamiento. No obstante, se han observado acanaladuras en el tronco y ramas de pomelos y naranjos dulces injertados sobre *P. trifoliata* (Muller y Campiglia, 1981) y fruta de calibre pequeño, síntomas que se corresponderían con la presencia de aislados severos de CTV que podrían estar limitando el potencial productivo de las plantas cítricas. Además, la constatación en Nueva Zelanda de cepas de CTV que superan la resistencia de *P. trifoliata* (Harper et al. 2010, Dawson y Money 2000) constituye una amenaza para nuestra citricultura. En Uruguay desde el año 2010 se desarrolla el Programa Nacional de Saneamiento de Citrus y la tristeza como enfermedad de propagación vegetativa, es eliminada en esta instancia. Sin embargo, la coexistencia del virus y el vector en el campo, no impiden que una planta saneada sea infectada en poco tiempo (Gottwald et al., 1996b), por lo que el saneamiento por sí solo no contribuye al manejo de la enfermedad en nuestras condiciones. Desarrollar un programa de protección cruzada (Costa y Müller 1980, Müller y Costa 1987), técnica que consiste en “el uso de un aislado suave de un virus para proteger frente a daños económicos causados por la infección de una cepa/s severa/s del mismo virus” (Gonsalves y Garnsey, 1989), sería una alternativa de manejo interesante para disminuir los efectos del virus en la producción nacional.

Siendo, la primera instancia para implementar este mecanismo, conocer las características de los aislados locales.

1.1. EL CULTIVO DE CÍTRICOS

El término “cítricos” hace alusión al conjunto de especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* de la familia *Rutaceae*, subfamilia *Aurantioidea*. Son árboles o arbustos perennes, cuyos frutos son hesperidios de 3 a 10cm de longitud, muy importantes en la dieta humana por su alto contenido de antioxidantes y vitamina C. Estas especies son originarias del sudeste asiático, su cultivo probablemente se inició en China y posteriormente se dispersó a otras zonas del mundo (Davies y Albrigo, 1994). En la actualidad, los cítricos están ampliamente distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales, fundamentalmente entre la latitud 40°N y 40°S. La amplitud térmica óptima para el desarrollo del cultivo está comprendida entre 23°C y 34°C, requieren entre 1000 y 1300mm anuales distribuidos regularmente y prefieren suelos profundos, bien drenados, arenosos o de texturas medias y ligeramente ácidos (Palacios, 1978). Actualmente, se cultivan en el mundo 7 millones de ha, con una producción anual aproximada de 115 millones de toneladas por año, constituyendo el cultivo frutal más importante a nivel mundial (FAO, 2012). Los principales países productores son China, España, Sudáfrica, Brasil y Estados Unidos.

Las especies cítricas sembradas se pueden concentrar en cuatro grupos: a) naranjas, que incluye naranjas dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y amargas (*C. aurantium* L.); b) mandarinas; c) limones (*C. limon* (L.) Burm. f.) y limas (*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.); d) pomelos (*C. paradisi* Macf.). Dentro de un mismo grupo de cítricos existe un alto número de variedades, con escasa variabilidad genética entre ellas. Las variedades suelen distinguirse por diferencias en caracteres de interés agronómico, tales como la época de floración y maduración de frutos, el calibre de los frutos, la cantidad de jugo, tolerancia a enfermedades, etc.

El cultivo comercial de cítricos se realiza por la técnica de injerto, mediante la cual yemas de la variedad seleccionada son injertadas sobre un portainjerto obtenido de

semilla, permitiendo combinar las cualidades de la variedad y el patrón de modo de lograr mayores rendimientos y calidad de fruta. Esta técnica de propagación es de gran importancia productiva y comercial porque permite reproducir las características productivas deseadas, entrar rápidamente en producción, homogeneizar el monte, etc.; pero tiene dos grandes inconvenientes: reduce la diversidad genética del cultivo y perpetúa patógenos transmisibles por injerto. Los portainjertos son esenciales en este cultivo, inciden directamente sobre el vigor y tamaño de la variedad, la producción y pueden tener tolerancia o resistencia a distintos factores bióticos y abióticos. Sí bien existen varios genotipos, cada región productora utiliza el que le proporciona mayores ventajas (rendimiento y calidad de fruta). No obstante, el uso de un único genotipo es altamente riesgoso, pues la aparición de un patógeno o factor abiótico que incida sobre él comprometerá la vida del cultivo.

1.2 LIMITANTES PRODUCTIVAS DE LOS CÍTRICOS

Hay factores abióticos y bióticos que pueden afectar negativamente el volumen y la calidad de la fruta producida. Entre los factores abióticos se pueden citar: la salinidad y alcalinidad de los suelos, el anegamiento, las sequías, heladas, altas temperaturas, etc., la duración de éstos fenómenos pueden incluso comprometer la vida de la planta. Los factores bióticos están asociados a la presencia de organismos patógenos. Los cítricos son susceptibles a una amplia gama de microorganismos (hongos, bacterias, virus y viroides), en el cuadro 1 se presentan algunas de las principales enfermedades trasmisibles por vía propagativa que causan importantes pérdidas productivas a nivel mundial (Timmer et al., 2000), algunas de ellas no están presentes en Uruguay.

Cuadro 1. Principales enfermedades de los cítricos transmisibles por material propagativo.

Enfermedad	Agente causal	Presencia en Uruguay
Huanglongbing HLB	<i>Candidatus Liberibacter africanus</i> <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> <i>Candidatus Liberibacter americanus</i>	
Clorosis variegada	<i>Xylella fastidiosa</i>	
Cancrosis	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv citri	x
Psorosis	<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV)	x
Tristeza	<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)	x
Muerte súbita	Virus similar a CTV	
Exocortis	Viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd)	x
Caquexia	Viroide II de los cítricos (CVd-II)	x

Ciertos patógenos, tales como *Phytophthora* spp y el virus de la tristeza (CTV), han comprometido de tal forma el cultivo de cítricos que obligaron a una rápida reconversión del patrón utilizado. Algunas enfermedades transmisibles por injerto se pueden controlar mediante la utilización de material vegetal que provenga de programas de saneamiento y certificación (Navarro et al. 2002, Navarro 1993). En cambio, para aquellas enfermedades que además del injerto, son transmisibles por herramientas de corte o vectores son necesarias otras medidas de manejo como la utilización de genotipos resistentes, el control de vectores o la protección cruzada (Cambra y Moreno 2000), siendo la tristeza una de las principales enfermedades con estas características, ampliamente distribuida y endémica en muchas regiones del mundo.

1.3 LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

La Tristeza es considerada una de las enfermedades más importantes y devastadoras de la citricultura a nivel mundial, se estima que más de 100 millones de árboles han muerto en todo el mundo a causa de esta enfermedad (Cambra y Moreno 2000, Bar-Joseph et al. 1989). El término “Tristeza” hace alusión al declinamiento que muestran las especies cítricas afectadas cuando están injertadas sobre el portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium L.*). Esta enfermedad es causada por un virus limitado al floema denominado *Citrus tristeza virus* (CTV).

Sí bien, es altamente probable que este virus sea originario del sudeste asiático, los síntomas de declinamiento y muerte de plantas, asociados a tristeza, fueron observados en Australia antes de 1890 y en Sudáfrica en la década de 1910 (Webber y Broadbent 1925, citados por Roistacher et al., 2010). A fines del siglo XIX, el naranjo agrio ya había sido utilizado en Australia y Sudáfrica sin éxito, pues cuando injertaban naranja dulce sobre agrio los árboles no crecían y en un corto periodo de tiempo morían. En ese momento, asumieron que existía un problema de incompatibilidad variedad-portainjerto (Webber 1925 y Toxopeus 1937, citados por Bar-Joseph et al., 1989), un problema nutricional, o una enfermedad de raíz, pero seguramente era debido a infecciones por CTV; pues, según Fraser y Broadbent (1979), citados por Roistacher et al. (2010), la Tristeza y su vector estarían presentes en Australia antes de 1870. Más tarde, el movimiento de plantas infestadas y el vector dispersaron el patógeno a todas las regiones citrícolas del mundo. En las primeras décadas del siglo XX grandes embarcaciones de cítricos llegaron a Sudamérica provenientes desde Sudáfrica y Australia, seguramente estas plantas portaban la enfermedad y el vector. No obstante, un factor clave para la dispersión del virus fue el uso generalizado, en aquel momento, del portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), pues a mediados del siglo XIX la afección masiva del portainjerto naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.)Osbeck) por *Phytophthora* sp., condujo a la rápida adopción del naranjo agrio como patrón tolerante (Bar-Joseph et al., 1989); sin embargo, éste resultó altamente susceptible a Tristeza, por lo que la enfermedad se propagó rápidamente.

El primer reporte de declinamiento y muerte de plantas de naranjo dulce injertados sobre agrio fue en Argentina en 1930 (Bar-Joseph et al. 1989, Wallace 1978), luego, en 1937 los mismos síntomas fueron observados en Brasil, donde la enfermedad fue denominada “tristeza” (Moreira, 1942). Síntomas asociados con el virus comenzaron a manifestarse en muchas regiones productoras de cítricos en todo el mundo. En 1938, la producción de limas en Ghana comenzó a ser devastada por la enfermedad, las plantas no crecían, se observaba aclaramiento de nervaduras (“vein clering”) en hojas jóvenes, muerte de ramas (“die-back”) y severas acanaladuras (“stem pitting”) en la madera (Hughes y Lister, 1949); allí la afección recibió el nombre “die-back of

limes”. En 1939 se registró una epidemia en California, Estados Unidos (Wallace, 1978), donde la llamaron “quick decline”; la denominaron “stem pitting” en Sudáfrica cuando afectaba a pomelos (*Citrus paradisi* Macf.) (Oberholzer et al., 1949) y “seedling yellows” cuando afectaba a plantas de semilla de limonero cv. Eureka, naranjos cv. Sevilla, pomelos cv. Marsh, mandarinos cv. Ellendale y citrones en Australia, y enanismo en plantas de “Hassaku dwarf” y “Natsudaidai dwarf” en Japón (Cambra y Moreno 2000, Roistacher 1995, Bar-Joseph et al. 1989). Finalmente, se concluyó que todos estos síntomas eran generados por un mismo agente causal (Cambra y Moreno 2000, Wallace 1978). Meneghini (1946) logró transmitir la enfermedad con los áfidos y confirmó la naturaleza viral de la misma (Bar-Joseph et al., 1989). El virus produce la necrosis de las células del floema en el naranjo agrio, lo que impide la translocación del almidón producido en las hojas a las raíces, con el tiempo las raíces consumen el almidón almacenado y empiezan a morir, lo que lleva a la muerte definitiva del árbol (Schneider, 1959).

Aún, continúan reportándose focos de CTV en muchas regiones productoras de cítricos del mundo (Papic et al. 2005, Davino et al. 2003). Esta enfermedad ha implicado cuantiosas pérdidas económicas para el sector cítrícola mundial, no solo por los millones de plantas muertas, sino porque también hizo necesaria la implementación de programas de cuarentena, estrategias de prospección y erradicación, desarrollo de técnicas de diagnóstico, programas de certificación de plantas (Cambra y Gorris 2003, Bar-Joseph et al. 1989) y utilización de portainjertos resistentes a tristeza, que son susceptibles a otras enfermedades y de menor vigor. En sitios donde el virus y el vector son endémicos se ha recurrido a la utilización de portainjertos resistentes, pero aún así, se han reportado pérdidas de productividad en pomelos y variedades de naranjo dulce por las acanaladuras en la madera generadas por aislados severos de CTV (Van Vuuren y Da Graça 2000, Bar-Joseph et al. 1989).

1.3.1 Síntomas

Como fue mencionado, varios síntomas fueron asociados a esta enfermedad, pero la expresión y severidad de éstos depende de la interacción de los factores que conforman el patosistema: aislamiento, hospedero-portainjerto, clima, vector (Rocha-

Peña et al., 1995). El rango de síntomas puede ir desde plantas asintomáticas, plantas con síntomas leves y muerte de plantas cuando están injertadas sobre naranjo agrio (Cuadro 2).

Cuadro 2. Síntomas de CTV observados en campo (Garnsey y Lee, 1988).

Síntomas	
Declinamiento	<ol style="list-style-type: none"> 1. Declinamiento del árbol al estar injertado en NA, el árbol se marchita y muere 2. Declinamiento lento 3. Retraso del crecimiento 4. Protuberancia encima del injerto, el tallo toma un diámetro superior por encima del injerto
Acanaladuras en la madera	<ol style="list-style-type: none"> 1. Acanaladuras en el tronco y ramas 2. Tamaño de fruta pequeño y retraso del crecimiento 3. Retraso del crecimiento
Amarillamiento del plantín	<ol style="list-style-type: none"> 1. Clorosis y retraso del crecimiento en plantines de limón, toroja y lima <p>Cuando el árbol es adulto puede manifestar acanaladuras o declinamiento</p>

Existen tres síntomas típicos inducidos por CTV (McClellan, 1974):

Declinamiento o Marchitez (D): es el síntoma característico de esta enfermedad (Figura1: A, B), los árboles presentan clorosis generalizada, defoliación y pudrición de raicillas. Ocurre en todas las especies de cítricos, excepto en limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.f.), cuando están injertadas sobre naranjo agrio. Este daño se origina por la necrosis de las células del floema debajo de la zona del injerto (Figura1: C), impidiendo el movimiento de nutrientes hacia las raíces. La pérdida de reservas de almidón produce la muerte de las raíces y posteriormente, la aparición de síntomas en la parte aérea, que finaliza con el colapso de la planta (Schneider, 1954). Este síntoma puede manifestarse en unas pocas semanas u ocurrir en forma gradual en un lapso de dos años.

Acanaladuras en la madera o “stem pitting” (SP): consiste en la presencia de estrías o acanaladuras longitudinales a nivel del xilema y/o proyecciones puntiagudas de la corteza (Figura1:D1, D2 y D3) (Schneider 1959, Wallace 1978). Puede ocurrir sobre la madera de la variedad y/o del pie, es típico en pomelos, naranjo dulce y lima mexicana, independientemente del portainjerto utilizado. Es uno de los síntomas más

importantes porque no es resuelto con el uso de portainjertos resistentes a tristeza y está asociado a reducciones en el tamaño de fruta (Figura1: E1, E2) y rendimiento (Rocha-Peña et al., 1995).

Amarillamiento del plantín o “seedling yellows” (SY): puede manifestarse en naranjo agrio, limonero o pomelo, aunque normalmente en condiciones de invernadero (Roistacher y Bar-Joseph 1984, Fraser 1952). Este síntoma, que reúne una fuerte reducción en el tamaño del plantín y severa clorosis del follaje (Figura1: G), sirve para caracterizar aislados severos en indexajes biológicos (Garnsey et al., 1987b).

Otro síntoma característico de CTV es el aclaramiento de nervaduras o “vein clearing” (Figura1: H), se manifiesta en algunas especies cítricas tales como: lima mexicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), lima dulce de Palestina (*C. limettioides* Tan.), cidro Etrog (*C. medica* L.), *C. macrophylla*, entre otras (Cambra y Moreno, 2000). Además, en indexajes biológicos, el virus puede inducir a la formación de hojas con formas de cuchara, enanismo, distintos grados de clorosis y nervaduras corchosas (Figura1: F) (Garnsey et al., 2005).

La lima mexicana ha demostrado ser la especie más sensible a la expresión de los síntomas, aún cuando se trate de un aislado poco agresivo; por ello ha sido seleccionada como planta indicadora universal para este virus (Roistacher, 1995).

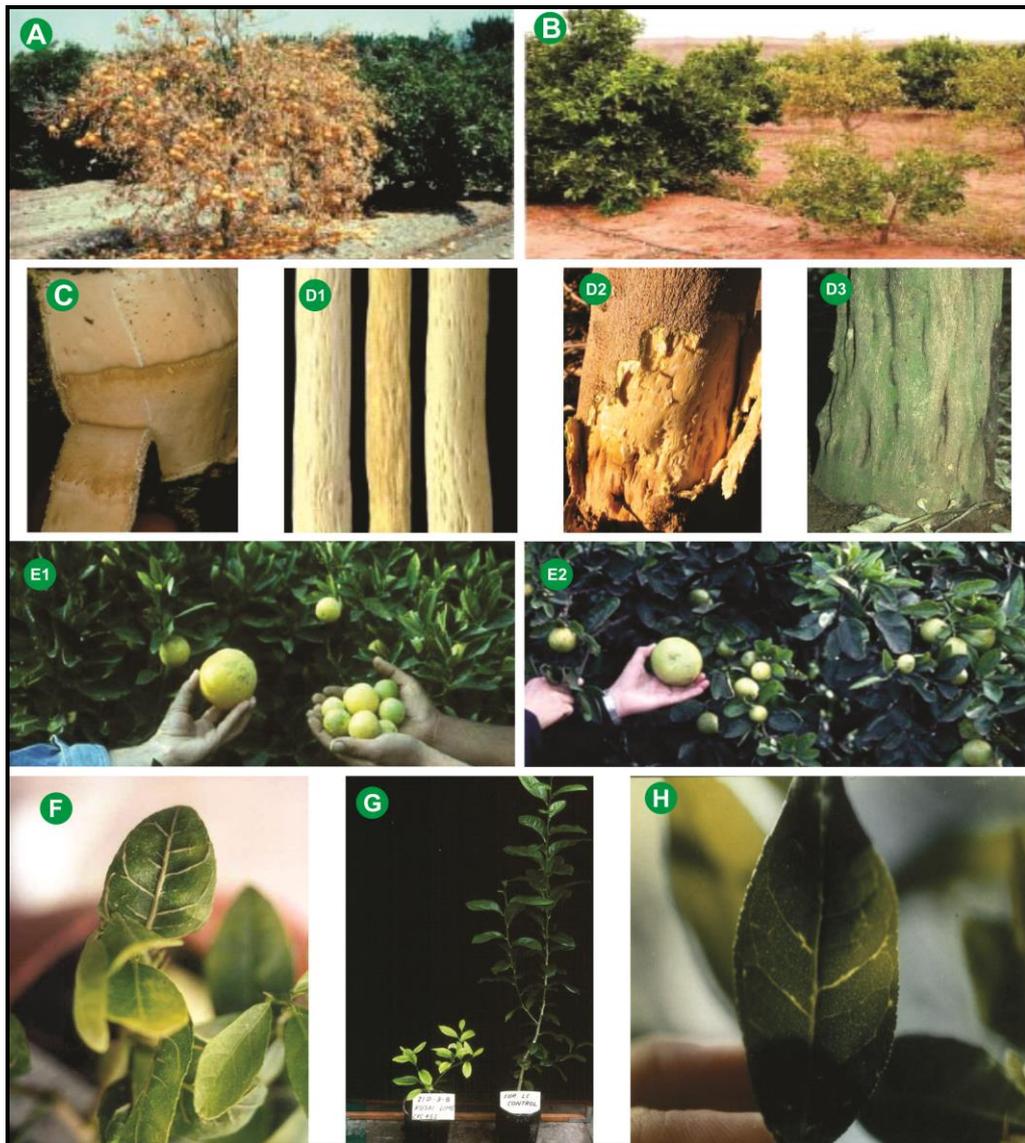


Figura 1. Síntomas de CTV: A) Árboles con el síntoma de declinamiento rápido en naranjo dulce injertado sobre naranjo amargo. B) Árboles en diferentes estados de declinamiento. C) Necrosis de las células del floema debajo de la zona del injerto. D1) Acanaladuras en ramas. D2- D3) Acanaladuras en tronco. E1-E2) Frutos de pomelo injertado en *P. trifoliata* afectados por SP severo. F) Nervaduras corchosas en hoja de lima mexicana. G) Plantín enano y amarillento inoculado con una cepa de CTV que produce SY (izquierda) y plantín de aspecto normal inoculado con un aislado suave de CTV (derecha); H) Aclaramiento de nervaduras en hoja de lima mexicana. (Fuente: Roistacher et al. 2010, Moreno et al. 2008).

1.3.2 Agente causal: *Citrus tristeza virus* (CTV)

Kitajima et al. (1964) encontraron y describieron por primera vez partículas virales en tejidos de cítricos afectados por tristeza. *Citrus tristeza virus* pertenece al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph et al., 1979). Esta familia reúne virus fitopatógenos con ARN de gran tamaño, cadena sencilla y sentido positivo. Tienen un amplio rango de hospederos y generalmente se encuentran limitados al floema. Son transmitidos a las plantas en forma semi-persistente por insectos de la familia Homóptera, tales como pulgones, cochinillas y moscas blancas (Brunt et al., 1996).

CTV es un virus filamentososo de aproximadamente 2.000 nm de largo por 10-12 nm de ancho (Karasev et al., 1995), siendo el virus de mayor tamaño que afecta plantas (Manjunath et al., 2000). Las partículas virales pueden ser observadas por microscopía óptica y electrónica (Garnsey et al. 1980, Bar-Joseph et al. 1974), además produce cuerpos de inclusión característicos en las células afectadas (Schneider, 1959).

1.3.2.1 Características genómicas de CTV

El genoma de CTV está constituido por una hebra simple de ARN de 19.226-19.296 nucleótidos, de polaridad positiva. Este ARN está encapsulado por dos proteínas de cápside (PC), la PC 25 Kda cubre el 95% de la longitud del virión y la PC 27 Kda que encapsida los ~630 nt terminales del ARN, conformando una estructura con apariencia de una serpiente cascabel (Cambra y Moreno, 2000). El genoma está organizado en 12 marcos de lectura abierta (ORFs, *Open Reading Frames*), con capacidad para codificar al menos 19 proteínas (Figura 2) (Karasev et al., 1995). ORFs 1a y 1b codifican poli-proteínas requeridas para la replicación del virus (Moreno et al., 2008). Los restantes ORFs codifican para: las proteínas de cápside (P25 y P27); proteínas involucradas en el ensamblaje de virones (P65 y P61); proteínas con rol en el movimiento del virus (P6); proteínas supresoras del silenciamiento del ARN (P20, P23 y P25) (Lu *et al.*, 2004) y proteínas cuya función es determinar el rango de hospederos del virus (P33, P13 y P18) (Tatineni et al., 2008). Las proteínas P20 y P23 estarían ligadas a la patogenicidad del virus, ya que

se ha encontrado que P20 se acumula en los cuerpos de inclusión de las células infectadas (Gowda *et al.*, 2000), mientras que P23 estaría relacionada con la inducción de síntomas de aclaramiento de nervaduras en lima mexicana (Fagoaga *et al.*, 2005). Según Tatineni *et al.* (2008) P6 y P20 estarían implicados en la translocación o infección sistémica de CTV. Las proteínas estructurales PCm, HSP70h y P61 podrían estar involucradas en la transmisión del áfido (Barzegar *et al.* 2009, Febres *et al.* 1996). El genoma, tiene además, dos zonas no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3' (Moreno *et al.*, 2007). Según el análisis de varias secuencias del virus el extremo 3' es altamente conservado con una identidad entre aislados superior al 95% y el extremo 5' es muy variable con valores de identidad, en algunos casos, inferiores al 50% (Pappu *et al.*, 1994).

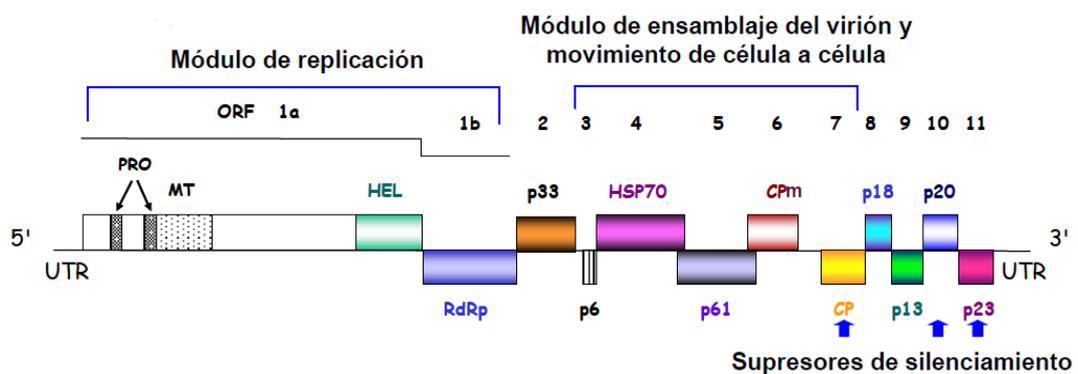


Figura 2. Representación gráfica de la organización del genoma de CTV. Números correlativos indican los marcos de lectura abierta. Las cajas representan los genes y las anotaciones inferiores a los números indican las proteínas que codifican (Fuente: Ruiz-Ruiz, 2009).

1.3.2.2 Diversidad genética de aislados

Los aislamientos de CTV obtenidos de distintos hospederos y regiones geográficas presentan gran variabilidad genética y reacciones biológicas (Moreno *et al.*, 2008). La mayoría de ellos son poblaciones complejas, constituidas por mezclas de genotipos (Albiach-Martí *et al.*, 2000a). Estas mezclas pueden incluir variantes genómicas, ARN defectivos (d-ARN) y genomas quiméricos, que posiblemente se generaron por eventos de recombinación, mutación e infecciones mixtas, producto de la coexistencia durante años del hospedero y el vector en el campo (Iglesias *et al.*

2008, Mendoza et al. 2005). Esta variabilidad genética induce, dependiendo del hospedero y el vector, diferentes respuestas en patogenicidad (Moreno et al., 2008). Sí bien, en un intento por diferenciar aislamientos, estos han sido agrupados según los síntomas que producen en: aislados tipo DI (“*decline inducing*”) que generan declinamiento, aislados tipo SP (“*stem pitting*”) que producen acanaladuras en la madera, y aislados tipo SY, que ocasionan el síndrome de amarillamiento de plántulas; los aislamientos que producen síntomas leves o son asintomáticos pueden contener variantes genómicas capaces de inducir síntomas severos (Moreno et al., 1993). La distribución de las variantes genómicas puede ser diferencial dentro de una planta y segregar mediante el pasaje de un pulgón, el material de propagación seleccionado, o por el cambio hospedero (Mendoza et al. 2005, Ayllón et al. 1999). Se han obtenido poblaciones de aislados diferentes a los que constituían una población inicial del virus al pasarlo mediante pulgones desde una planta donante a una receptora (Albiach-Martí et al. 2000c, Cambra et al. 1993). Por lo que, tanto la transmisión por el vector, como la propagación de plantas desde material enfermo puede derivar en cambios estructurales de la población viral (Ayllón et al., 1999).

Las secuencias completas de varios aislamientos de CTV de distintas regiones del mundo han sido reportadas: T36 (Pappu *et al.*, 1994) y T30 (Albiach-Martí et al., 2000a) de Florida, VT de Israel (Mawassi et al., 1996), T385 (Vives et al., 1999) y T318A (Ruiz-Ruiz et al., 2006) de España, SY568 (Vives et al., 2005) de California, NUagA de Japón (Suastika et al., 2001) y Qaha de Egipto (GenBank accession number AY340974) y más recientemente B165 de India, NZ-M16 y NZ-B18 de Nueva Zelanda, entre otras. Si bien, la organización genómica de estos aislados es similar, las secuencias son significativamente diferentes (Vives et al. 1999, Mawassi et al. 1996). Con la secuenciación de los primeros tres genomas de CTV: T36 (Karasev *et al.*, 1995), VT (Mawassi et al., 1996) y T385 (Vives et al., 1999) ya fue posible observar marcadas diferencias entre ellos, por lo que en ese momento se postuló que CTV podría haber evolucionado en al menos dos genotipos diferentes; por un lado, VT y T30 y por otro T36 (Hilf et al., 1999). Las secuencias de los aislados T36 y VT revelaron valores de identidad de nucleótidos por debajo del 70% (Mawassi et al., 1996), una diferencia inusual entre aislados de un mismo virus, lo

que sugiere que uno de los dos genomas pudo haber resultado de una recombinación del ARN (Bar-Joseph et al., 1989). Sin embargo, los aislados T30 de Florida y T385 de España, separados geográficamente y temporalmente, son esencialmente idénticos, por lo que se han mantenido estables por muchísimos años (Albiach-Marti et al., 2000a), al igual que los aislados T36 de Florida y Qaha de Egipto. Este virus tiene gran variabilidad, tal es así, que de los aislados secuenciados recientemente, el NZB 18 (Nueva Zelanda) y B165 (India) pertenecen a un nuevo genotipo virulento (Harper et al., 2009), NZM16 (Nueva Zelanda) representa un fenotipo asintomático y NZTH30, NZTH28, NZM12 y NZG90 (Nueva Zelanda) quiebran la resistencia de los genes de *P. trifoliata* (Harper et al., 2010). No obstante, se ha determinado que la mayoría de los aislados de CTV puede clasificarse en seis grupos según el genoma mayoritario: T3, T30, T36, VT, T68, y RB (Harper, 2013), aunque algunos aislados escapan a esta clasificación (Folimonova et al., 2010). La secuenciación de nuevos aislados, demuestra que existe alta diversidad en la población del virus, mientras algunos aislados están constituidos por una secuencia predominante y algunas variantes estrechamente relacionadas, otros tienen una estructura compleja con variantes de secuencias altamente divergentes (Ayllón et al., 2006). Los nuevos genotipos han surgido de mutaciones, de eventos recombinación, selección y deriva genética, resultantes de las reiteradas inoculaciones de los árboles en campo, así como también del movimiento de yemas infectadas entre regiones (Moreno et al., 2008). Por esto, Harper (2010) propone que para utilizar un aislado en un programa de protección cruzada, así como, para generar variedades resistentes, es necesario conocer las presiones selectivas de recombinación y las restricciones que actúan sobre las cepas de CTV. De esta forma, se obtendrían secuencias de CTV que tenderían a permanecer relativamente estables durante un período de tiempo importante, de modo que, estrategias de control basadas en plantas transgénicas por PTGS (del inglés *post-transcriptional gene silencing mechanism*) o el mecanismo de protección cruzada tendrían una mayor probabilidad de éxito (Folimonova et al. 2010, Albiach-Marti et al. 2000a).

1. 3.3 Principales hospederos

El virus de la tristeza está restringido a la familia *Rutaceae* y en particular a las especies e híbridos de los géneros *Citrus* y *Fortunella*. El tipo y severidad de síntomas de CTV en campo depende de la especie huésped, de la combinación variedad-portainjerto, del aislado del virus y de las condiciones ambientales (Costa y Grant, 1951). La lima mexicana y el cidro, son muy sensibles y muestran síntomas con casi todos los aislados (McClellan 1974, Grant y Higgins 1957), por lo que han sido utilizadas como plantas indicadoras. *C. macrophylla*, el naranjo agrio y el limón también son susceptibles a la infección por CTV. Los mandarinos, en cambio, son frecuentemente tolerantes (Bitters, 1972), aunque se ha observado en algunos casos presencia de acanaladuras en la madera (Muharam y Whittle 1991, Koizumi 1991). Los pomelos, naranjos dulces y kumquats, tienen una sensibilidad intermedia y muestran síntomas con algunos aislados (Bitters, 1972). El virus también ha sido inoculado en especies de géneros afines al género *Citrus*, pero sólo se ha multiplicado en algunas especies de *Passiflora* (Roistacher y Bar-Joseph 1987a, Müller et al. 1974). *Poncirus trifoliata* ha mostrado resistencia frente a la infección por CTV, esta especie impide el movimiento del virus, ya que éste se replica bien en sus protoplastos (Albiach-Martí et al., 2004). Estudios genéticos han confirmado la presencia de al menos dos genes involucrados en dicha resistencia (Mestre et al., 1997). No obstante, en Nueva Zelanda han surgido aislados que han quebrado la resistencia de *P. trifoliata* (Dawson y Mooney, 2000). También, algunos híbridos entre *P. trifoliata* y naranja dulce (citranges) y las especies *Swinglea glutinosa* y *Severinia buxifolia* han mostrado resistencia frente a cepas de CTV (Cambra y Moreno 2000, Garnsey et al. 1987a). Por lo tanto, existe una compleja interacción entre los huéspedes y el virus que puede dar lugar a una amplia gama de respuestas en patogenicidad desde un alto grado de susceptibilidad a la resistencia.

1.3.4 Epidemiología

El virus de la tristeza puede ser transmitido a plantas sanas mediante injerto de material infectado a través de pulgones y experimentalmente en forma mecánica

(Garnsey y Müller, 1986), pero no por semilla (Roistacher, 1991). Por lo tanto la dispersión de CTV a nuevas áreas generalmente es consecuencia de la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión regional del virus la provocan diversas especies de pulgones. La eficiencia de transmisión de CTV puede ser afectada por la especie de áfido, la especie huésped del virus, la receptora y el aislado de CTV. El naranjo dulce es la especie en la que resulta más fácil adquirir el virus y es también la más sensible a la infección (Bar-Joseph et al., 1989). Se ha observado que en sitios donde hay un declinamiento generalizado de naranjos dulces sobre patrones de naranjo agrio, los pomelos no muestran síntomas tan severos. Las condiciones ambientales también inciden en la tasa de transmisión del virus, se ha reportado que temperaturas superiores a 30°C disminuyen los títulos del virus en la planta (Bar-Joseph et al., 1973), pueden suprimir los síntomas en campo y la detección de CTV a través de serología (Roistacher et al., 1974).

1.3.4.1 Transmisión por injerto

Fawcett y Wallace (1946) demostraron la transmisibilidad del patógeno por injerto al inocular con yemas de árboles infectados 100 plantas de naranjo dulce cv. Valencia injertadas sobre naranjo agrio. A los dos años del experimento el 86% de las plantas inoculadas habían declinado. Posteriormente, centros de investigación de Brasil, EEUU y Sudáfrica, desarrollaron el “*indexing*” o testaje biológico empleando lima mexicana como planta indicadora (Roistacher y Gumpf, 1986). La inoculación del virus mediante injerto en esta especie, constituye hasta hoy, uno de los métodos de diagnóstico más aceptado para CTV en los programas de certificación.

1.3.4.2 Transmisión por pulgones

En 1946, Meneghini fue capaz de transmitir la tristeza mediante áfidos infectados para demostrar la naturaleza viral de la enfermedad. CTV es transmitido por varias especies de áfidos (Figura 3) (Hermoso de Mendoza et al., 1984), de las cuales las más importantes son: *Toxoptera citricida* (Kirk.), *Aphis gossypii* (Glover); *A. spiraecola* (van der Goot), *T. aurantii* (Boyer de Fons.), y *A. craccivora* (Koch)

(Gottwald et al. 1996b, Roistacher y Bar-Joseph 1987b). Los pulgones transmiten el virus en forma semi-persistente, no circulativa, con un período de adquisición que varía de algunos segundos hasta una hora, pudiendo ser transmitido por 24 a 48 horas después de haberlo adquirido (Cambra et al. 2000a, Rocha-Peña et al. 1995). *Toxoptera citricida* es la especie más eficiente en transmitir el virus (Broadbent et al. 1996, Yokomi et al. 1994), incluso en transmitir las cepas más severas (Rocha-Peña et al., 1995) capaces de producir acanaladuras del tallo, por lo que es el vector más peligroso y ha sido, en gran parte, el responsable de la dispersión de CTV a nivel mundial. Su distribución geográfica ha aumentado estando presente actualmente en España y en el estado de la Florida (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/5427>). Sin embargo, aún existen países donde *T. citricida* no se encuentra presente, siendo *A. gossypii* el vector principal (Cambra et al. 2000a, Yokomi y Garnsey 1987). *A. spiraecola* y *T. aurantii* son menos eficientes (Yokomi y Garnsey 1987, Hermoso de Mendoza et al. 1984), pero si sus poblaciones son más numerosas que *A. gossypii*, pueden tener un papel importante en la dispersión de CTV (Hermoso de Mendoza et al., 1984).



Figura 3. A) Colonia de áfidos de: *T. citricida*; B) *Aphis gossypii*; C) *T. aurantii*; D) *A. spiraecola*.

1.3.4.3 Patrón de la distribución espacio-temporal de CTV

La distribución espacio-temporal de CTV está determinada por la especie de pulgón predominante y su densidad poblacional, el nivel de inóculo, así como por las especies cítricas presentes, ya que tienen diferente grado de sensibilidad frente al virus y porque también pueden resultar más o menos apetecibles para el pulgón (Cambra y Moreno, 2000). Las fluctuaciones en las poblaciones del vector y las diferencias en las tasas de transmisión de CTV, pueden provocar cambios bruscos en la incidencia y progreso de la enfermedad (Gottwald et al., 1996a). En localidades donde *A. gossypii* es el vector predominante, los árboles infectados muestran limitada agregación por lo que el progreso de la enfermedad ocurre lentamente, siendo necesarios de ocho a 15 años para obtener altas incidencias (95%). En cambio, cuando *T. citricida* es la especie predominante ocurre una alta y continua tasa de infección y esta se da en forma agregada por lo que es posible tener altas infecciones en pocos años (Gottwald et al., 1996a). Esto estaría relacionado con el hábito alimenticio del pulgón, ya que *A. gossypii* no es específico de cítricos y sus poblaciones son migratorias, en cambio *T. citricida* se alimenta especialmente de cítricos. Sin embargo, *A. gossypii* puede determinar un patrón agregado de CTV cuando se trata de montes adultos con copas muy cerradas, o sí además están presentes *A. spiraecola* y *T. aurantii* (Gottwald et al., 1996a).

1.3.5 Diagnóstico de CTV

El diagnóstico de CTV por síntomas observados en campo no es certero. Sí bien, los síntomas de decaimiento de plantas injertadas sobre naranjo agrio indicarían una infección por CTV, el declinamiento también puede tener otras causas (Cambra y Ambrós, 2011). Además, el virus puede estar presente en forma asintomática en plantas injertadas sobre pies tolerantes a tristeza (Cambra, 1983). Por eso, para el correcto diagnóstico de la enfermedad es necesario recurrir a pruebas adicionales. El virus puede detectarse mediante las siguientes técnicas:

1.3.5.1 Testajes biológicos

El diagnóstico biológico ha sido el método tradicionalmente utilizado para detectar la presencia de patógenos transmisibles por injerto. Las pruebas biológicas consisten en la utilización de plantas indicadoras que manifiestan los síntomas característicos de la enfermedad a diagnosticar. El método clásico de diagnóstico biológico de CTV ha sido la inoculación de material sospechoso en plantines de lima mexicana en condiciones de invernadero (22-26°C) (Wallace y Drake, 1951). En un período de 2 a 6 meses post-inoculación, las limas injertadas con material infectado por CTV, manifiestan aclaramiento de nervaduras, hojas en forma de cuchara y estrías en la madera (Roistacher, 1991). También se pueden utilizar otras especies indicadoras de CTV, tales como naranjo agrio (NA), pomelo Duncan (PD) y naranjo dulce (ND) cultivares Pineapple o Madams Vinous (Garnsey et al., 2005). Este método tiene como inconvenientes el excesivo tiempo que insume la detección de síntomas, el elevado costo (disponer de invernadero climatizado y mano de obra especializada) y la imposibilidad de aplicarla para análisis masivos.

1.3.5.2 Microscopía óptica o electrónica

La microscopía óptica permite determinar la presencia de agentes virales mediante la observación de cuerpos de inclusión en el floema y alteraciones citopáticas específicas (Garnsey et al. 1980, Bar-Joseph et al. 1974, Kitajima et al. 1964). Para la detección de CTV, el procedimiento de microscopía óptica de mayor aplicación es la observación de inclusiones virales que aparecen como grandes agregados en forma de bandas en el floema. Esta técnica en general no se usa en programas masivos de detección debido a su limitada capacidad de análisis y requerimiento de personal especializado.

1.3.5.3 Métodos serológicos

Consisten en detectar el virus por su reacción con anticuerpos específicos de la proteína de cubierta del virus. El método más popular es el ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) y para el caso de CTV ha sido ajustado por Bar- Joseph et al. (1979) y Cambra et al. (1979). Se han generado varios anticuerpos policlonales para

detectar el virus. Aunque, inicialmente hubo problemas de especificidad para detectar a diferentes aislados, luego con la producción de anticuerpos monoclonales específicos (Vela et al., 1986) se incrementó la sensibilidad de la técnica; siendo la mezcla de los anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 capaz de reconocer a todos los aislados de CTV (Cambra et al., 1990). Sí bien, los anticuerpos policlonales o la mezcla de anticuerpos monoclonales permiten el diagnóstico rápido de CTV, solo los monoclonales permiten discriminar entre aislados, por ejemplo, el anticuerpo MCA-13 reacciona selectivamente con aislados severos (Permar et al., 1990). La puesta a punto de la técnica inmunoenzimática ELISA tuvo enormes ventajas: alta sensibilidad, bajo costo, rapidez, y capacidad de uso masivo. Ha sido un avance fundamental para los programas de erradicación de CTV desarrollados en algunas zonas del mundo y para los estudios epidemiológicos del virus (Moreno et al. 2008, Bar-Joseph et al. 1989). Luego, a principios de la década del 90 se desarrolló el método de “Inmunoimpresión-ELISA” o “Tissue Print-ELISA”, que consiste en la impresión de cortes de tejidos vegetales en membranas de nitrocelulosa y su posterior revelado serológico por ELISA (Cambra et al. 2000b, Garnsey et al. 1993), evitando la extracción de tejidos vegetales.

1.3.5.4 Métodos moleculares

Se han desarrollado varias técnicas para la detección del ARN genómico de CTV, todas ellas basadas en el principio de la complementariedad de bases, siendo las más comunes la hibridación molecular con sondas de ARN o ADN (Narváez et al. 2000, Rosner y Bar-Joseph 1984) y la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR por su sigla en inglés) (Olmos et al. 1999, Nolasco et al. 1993).

La hibridación de ácidos nucleicos consiste en la unión del ácido nucleico del virus, previamente fijado a un soporte sólido (membrana de nitrocelulosa o nylon), con ácidos nucleicos complementarios que reciben el nombre de sondas (Narváez et al. 2000, Rosner y Bar-Joseph 1984). Las sondas son marcadas con reactivos y la detección de los híbridos formados se podrá realizar mediante autoradiografía, colorimetría o quimioluminiscencia en función del marcador utilizado. Este método tiene diferentes variantes: Southern-blot (para ADN), Northern-blot (para ARN) y

Dot-Blot o Slot-Blot (para ADN y ARN). La hibridación también puede realizarse utilizando impresiones de tejido sobre la membrana, esto conserva la muestra por más tiempo y permite enviarla a otros laboratorios para su análisis.

La técnica de PCR con transcripción inversa (RT-PCR) se utiliza porque CTV tiene genoma de ARN lo que imposibilita utilizar la metodología original de PCR para su detección. Debido a esto la PCR, debe ser precedida por la transcripción inversa (RT), en la cual el ARN es convertido a ADNc, por medio de la enzima transcriptasa reversa, en presencia de primers. Luego de sintetizado el ADNc, se procede a su amplificación mediante el procedimiento clásico de PCR, la detección del ADN amplificado es realizada por electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio o nitrato de plata (Ruiz-Ruiz, 2009). La RT-PCR es más laboriosa y tiene un costo más elevado que otras técnicas de diagnóstico. No obstante, existen algunas variantes de esta técnica que la optimizan y le otorgan mayor sensibilidad, tales como: a) RT-PCR con inmunocaptura (Nolasco et al., 1993) que captura o inmoviliza las partículas virales presentes en el extracto vegetal crudo mediante la técnica de ELISA, a la que luego se añade la mezcla de la RT-PCR; b) Nested-PCR o PCR anidada (Olmos et al., 1999) que consiste en someter la misma muestra de ADN a dos reacciones consecutivas de PCR, la primera con primers que amplifican una región más amplia y la segunda con primers específicos internos de la región primeramente amplificada; c) PCR múltiple, esta técnica permite co-amplificar productos génicos en una única PCR, utilizando más de una pareja de primers; d) PCR en tiempo real, detecta y cuantifica el virus en el tejido infectado y pulgones virulíferos (Ruiz-Ruiz et al. 2009, Bertolini et al. 2008), ésta es altamente sensible y permite el análisis de un mayor número de muestras en menor tiempo, pero es muy costosa para utilizarla como método de diagnóstico masivo. La PCR en tiempo real, al cuantificar el virus permite estudiar otros aspectos de este, tales como la asociación carga viral-intensidad de síntomas, la acumulación de variantes de secuencia específicas, su valoración en la transmisibilidad por el vector, etc. (Satyanarayana et al., 2001, 1999).

Los métodos moleculares se caracterizan por su alta especificidad y sensibilidad, pero requieren equipamiento específico y personal calificado.

1.3.6 Caracterización de aislados de CTV

Los síntomas presentes en árboles infectados difieren considerablemente, pues dependen de la sensibilidad del hospedador, de las condiciones climáticas y de la naturaleza patogénica del virus (Roistacher y Moreno, 1991). Estas características, determinan que el término severidad alta o moderada sea relativo (Garnsey et al. 1987b, Lee et al. 1987) dependiendo de los parámetros productivos de cada región. Por ejemplo, el aislado de CTV "Nartia" ampliamente utilizado en Sudáfrica para proteger naranjas de SP severo, produce cierto grado de clorosis foliar y causa un SP moderado. Por sus características, sí este aislado estuviera presente en Florida, sería considerado muy severo. Otro aspecto que complejiza la caracterización del virus es que dentro de una planta infectada existe una población de variantes genéticas de CTV (Garsney et al., 2005), que pueden segregarse luego de la transmisión por áfidos o al cambiar de hospedero (Albiach-Martí et al. 2000c, Hermoso de Mendoza et al. 1988). Sí bien, se han desarrollado numerosas técnicas biológicas, serológicas y moleculares para diferenciar aislados del virus en cuanto a su patogenicidad, aún no se ha establecido cuál de ellas sería la más apropiada.

1.3.6.1 Testajes biológicos

Esta técnica, como ya fue mencionada, evalúa la producción y severidad de síntomas generados por cada aislado en plantas indicadoras. El primer síntoma descrito para este virus fue el declinamiento de naranjos dulces, pomelos y mandarinos cuando estaban injertados sobre naranjo agrio. Sin embargo, más tarde se constató que algunos aislados no producían síntomas visibles de declinamiento (McClellan, 1974), pero sí generaban otros síntomas. Por ejemplo, en lima mexicana (*Citrus aurantifolia* Swing) aclaramiento de nervaduras, hojas en forma de cuchara y acanaladuras en la madera (Wallace y Drake, 1951); mientras que aislados inoculados en naranjo agrio, pomelos y limón (*C. limón* Burm.f.) podían inducir el síndrome de "amarillamiento del plantín" en condiciones de invernadero (Wallace, 1978). Más tarde, Balaraman y Ramakrishnan (1980) diferenciaron algunos aislados de CTV de la India utilizando pomelo; mientras que Calavan et al. (1980) encontró que el naranjo dulce cv.

“*Madam Vinous*” permitía detectar los aislados severos de California que producían acanaladuras en la madera.

En base a estas experiencias, Garnsey et al. (1987b) estandarizaron una metodología para la realización de bioensayos que permitiera diferenciar aislados de CTV; para ello, evaluaron en condiciones controladas, los síntomas inducidos por 266 aislamientos provenientes de distintos países. De esta manera, se estableció que los bioensayos deben realizarse en invernaderos con malla anti-áfidos y temperatura controlada (20-26°C), los aislamientos se inoculan mediante injerto de trozos de corteza en un set de 5 especies indicadoras: lima mexicana (LM), pomelo Duncan (PD), naranjo amargo (NA), naranjo dulce (ND), naranjo dulce sobre naranjo amargo (ND/NA), las cuales tienen sensibilidad diferencial frente a CTV. La LM genera síntomas con todos los aislados del virus, con mayor o menor intensidad, en ella es posible observar aclaramiento de nervaduras, hojas en forma de “cuchara” y acanaladura de madera (SP). El NA detecta los aislados inductores de amarillamiento de plantines (SY), en el PD se observan síntomas de aislados inductores de SY y SP, en ND se manifiesta el SP y en ND/NA se observa el declinamiento. La observación de estos síntomas puede requerir un período de 6 meses a un año, según la indicadora. Para diferenciar aislados por este método se evalúa el tipo de síntoma generado y su severidad de acuerdo a una escala. Finalmente, las reacciones obtenidas por cada aislado en las diferentes indicadoras, es comparada con los 11 grupos biológicos ya establecidos (Figura 4), según los patrones de síntomas producidos (Garnsey et al., 2005). Son considerados aislados severos de CTV, aquellos capaces de provocar “seedling yellows” (SY) y/o “stem pitting” (SP) en PD y ND. Durante años, éste fue el método más utilizado y confiable para caracterizar la severidad de aislados de CTV, pero es un procedimiento costoso y que requiere de al menos un año para la manifestación de todos los síntomas.

Grupo	Indicadoras				
	Lima	ND/NA	NA	Pomelo	N. dulce
0	○	○	○	○	○
1	X	○	○	○	○
2	X	X	○	○	○
3	X	X	X	○	○
4	X	X	X	X	○
5	X	X	X	X	X
6	X	X	X	○	X
7	X	X	○	X	X
8	X	○	○	X	X
9	X	X	○	X	○
10	X	○	○	X	○
	LR	DEC	SY	GSP	OSP

Figura 4. Representación esquemática de los 11 grupos establecidos por Garnsey et al., 2005. LR indica síntomas foliares y SP en lima mexicana, DEC indica clorosis y enanismo en la combinación ND/NA, SY indica reacción de seedling yellows en NA, GSP stem pitting en pomelo y OSP stem pitting en ND.

1.3.6.2 Métodos serológicos

Las técnicas serológicas permiten caracterizar aislados de CTV de una forma rápida, económica y simple, no obstante es necesario contar con una amplia gama de anticuerpos monoclonales. Sí bien, se dispone de varios de ellos, solo la reacción frente al anticuerpo MCA 13 (Permar et al., 1990) es capaz de discernir entre aislados por su severidad, ya que reconoce un epítipo conservado en los aislados severos y ausentes en los no severos (Pappu et al., 1993). Sin embargo, dentro de los severos, con el MCA 13 no es posible diferenciar sí producen SY, SP o ambos. También es posible detectar variaciones en la CP de los aislados mediante el análisis serológico de mapas de péptidos generados por digestión con endoproteasas (Albiach- Marti et al., 2000b).

1.3.6.3 Métodos moleculares

CTV es la única especie de *Closterovirus* que posee múltiples cepas filogenéticamente diferentes (Moreno et al., 2008) lo que complejiza su clasificación. Luego de la secuenciación parcial o total de varios aislados de CTV se comenzaron a implementar distintas técnicas moleculares para diferenciarlos tales como: análisis del Polimorfismo de Conformación de Cadena Simple o SSCP (del inglés *Single Stranded Conformational Polymorphism*, Rubio et al., 1996), hibridación con sondas específicas (Cevik et al., 1996), análisis de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción o RFLP (del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*, Gillings et al., 1993), amplificación por RT-PCR con primers específicos (Hilf et al., 2005) y PCR en tiempo real (Ruiz-Ruiz et al., 2009). Todas ellas, han sido utilizadas con el propósito de asociar síntomas fenotípicos a genotipos específicos.

La técnica *Single strand conformation polymorphism* (SSCP) es sencilla y permite la detección de pequeñas variaciones en la secuencia de nucleótidos de fragmentos de ADN, sin secuenciación; proporcionando una rápida caracterización para una población de aislados de CTV (Rubio et al. 2000, 1996). Mediante esta técnica, cada hebra de ADN adopta una conformación de plegado, determinada por la composición de bases del fragmento, pequeños cambios en la secuencia nucleotídica pueden cambiar la conformación del amplicón, y por tanto en su patrón de movilidad electroforética. De esta manera, cuando analizamos varios aislamientos es posible encontrar distintos polimorfismos en la secuencia de interés, lo que dará lugar a diferentes perfiles de bandas, que permitirán diferenciar aislados genéticamente. Esta técnica también es útil para estudiar los cambios poblaciones de CTV en el tiempo.

La hibridación con sondas de ADN también permite la discriminación de cepas de CTV mediante la utilización de sondas específicas que identifican determinadas secuencias. Así, la sonda 0 contiene una secuencia de nucleótidos conservada de la PC del virus y por tanto es una sonda universal para CTV. La sonda I hibrida con aislados inductores de DI y SY; las sondas II, III, IV y V hibridan con aislados del tipo SP; las sondas VI y VII hibridan con aislados suaves de Florida y de países

orientales respectivamente; la sonda VIII hibrida con todos los aislados suaves de CTV (Nibblet et al., 2000).

El análisis de *Restriction fragment length polymorphism* (RFLPs) es otra herramienta molecular que puede ser utilizada para evaluar la diversidad de una población viral. Mediante ésta técnica los productos amplificados por RT-PCR de los genes de la PC son digeridos por enzimas de restricción y el patrón de bandas obtenido es visualizado por electroforesis, las variaciones en secuencias serán determinadas por el patrón de bandas generado. Gillings et al. (1993) utilizando esta técnica obtuvo una considerable variación en 34 aislados de CTV analizados.

Las técnicas de RT-PCR permiten detectar variaciones genéticas entre aislados mediante el análisis de secuencias nucleotídicas de regiones no conservadas del genoma de CTV (extremo 5' de la partícula viral). Generalmente, se utilizan regiones específicas del genoma, ya que la secuenciación de genomas completos es costosa (Roy et al., 2005). En base a ésta metodología se han desarrollado distintos protocolos, tales como la RT-PCR múltiple que consiste en usar un set de primers específicos desarrollados a partir de regiones divergentes del extremo 5' del genoma de cuatro aislados tipo: T3, T30, T36 y VT (Hilf y Garnsey, 2000). El producto amplificado de los aislados en evaluación, podrá guardar relación o no con uno de estos genotipos, por lo cual además de caracterizar aislados esta técnica permite identificar genotipos específicos de CTV. Sin embargo, posteriormente Hilf et al. (2005), al realizar un análisis de 372 aislados de CTV procedentes de diferentes países, determinó que sólo parte de éstos pudieron ser relacionados con un aislado-tipo, mientras el resto correspondió a infecciones mixtas o no pudo ser clasificado. Con esta técnica Hilf y Garsney (2000) diferenciaron dos grandes grupos representados por los aislados VT y T36, siendo el grupo VT constituido por tres genotipos específicos: T3, T30 y VT. Sin embargo se observó variabilidad en patogenicidad, incluso entre los aislamientos que compartían el mismo genotipo, por lo que no fue posible la asociación de un síntoma específico con uno de estos genotipos específicamente. A pesar de ello, los genotipos T3 y VT estuvieron asociados con la presencia de SP en ND; el genotipo T3 generalmente presentó

mayor incidencia y severidad de síntomas y el genotipo T30 manifestó menor incidencia de síntomas.

Otro protocolo consistió en el análisis de las secuencias del gen p23 (relacionado con la patogenicidad) amplificado por RT-PCR (Sambade et al., 2003). El análisis filogenético y la comparación en variaciones de las secuencias predominantes del gen p23 de 18 aislamientos de diferentes orígenes, permitió definir tres grupos correlacionados con la intensidad de síntomas producidos: a) suaves: aislados que inducen síntomas suaves o moderados en LM y en algún caso declinamiento en la combinación ND/NA, aislados T30 y T385; b) severos: que causan SY y SP en ND o PD, aislados SY568R, T318A, NUagA y VT; c) grupo atípico, con síntomas variables, aislados T36 y Qaha (Figura 5). Las identidades nucleotídicas dentro de cada grupo fueron superiores al 97.5%, mientras que la identidad más baja ocurrió entre los aislados VT y Qaha (75.6%) (Ruiz- Ruiz, 2009).

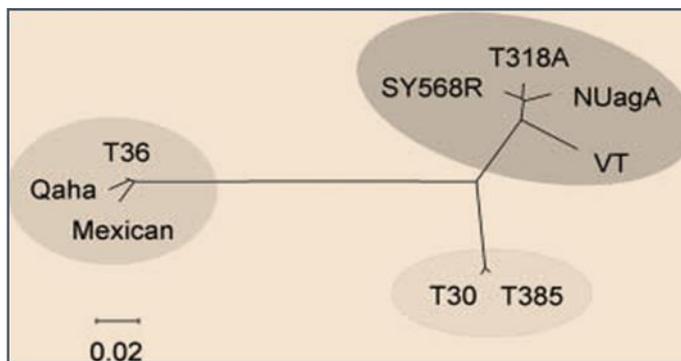


Figura 5. Árbol filogenético obtenido con el método *Neighbor-Joining* con un apoyo de 1000 bootstraps, a partir de secuencias completas de CTV. Fuente: Moreno et al., 2008.

El protocolo desarrollado más recientemente es el de Real-time PCR. La técnica consiste en la diferenciación de aislados suaves y severos mediante el valor de temperatura en las curvas de fusión de los productos amplificados (T_m). Ruiz-Ruiz et al. (2006) pudieron identificar correctamente como severos o suaves mediante la comparación de los valores de T_m al 90% de 56 aislados de CTV, procedentes de 20 países, los cuales además fueron caracterizados biológicamente. Sin embargo, la

presencia de variantes de secuencia ha dado lugar a valores intermedios de T_m que pueden dificultar la caracterización de un aislado. Para ello, se desarrolló un protocolo de RT-PCR cuantitativa a tiempo real utilizando tres sondas TaqMan específicas, una de ellas reacciona con los aislados suaves, otra con los aislados severos que inducen SP y otra con aislados severos inductores de SY y/o SP (Ruiz-Ruiz et al. 2009, Ruiz-Ruiz et al. 2006).

Las técnicas de RT-PCR permiten diagnosticar y caracterizar las cepas y poblaciones del virus en forma rápida y específica.

Hasta el momento, la comparación de las secuencias estudiadas han mostrado: a) un alto grado de conservación entre genomas de CTV separados en el tiempo y espacio, con un repertorio limitado de genotipos (Ruiz-Ruiz et al. 2006, Albiach-Martí et al. 2000a) y b) una estructura poblacional variable entre aislados, algunos de ellos compuestos por una variante de secuencia mayoritaria y otros que presentan una estructura compleja con variantes de secuencia altamente divergentes (Ayllón et al. 2006, Vives et al. 2005). Se considera, más oportuno, para realizar una clasificación genotípica realizar construcciones filogenéticas: utilizando la región ORF 1a/1b del extremo 5' del genoma, ya que ha mostrado alta divergencia entre genotipos (Albiach-Martí et al. 2000c, Hilf et al. 1999), o mediante la secuenciación de genomas completos; Harper (2013) obtuvo seis genotipos mediante esta técnica (Figura 6), pero es una alternativa costosa.

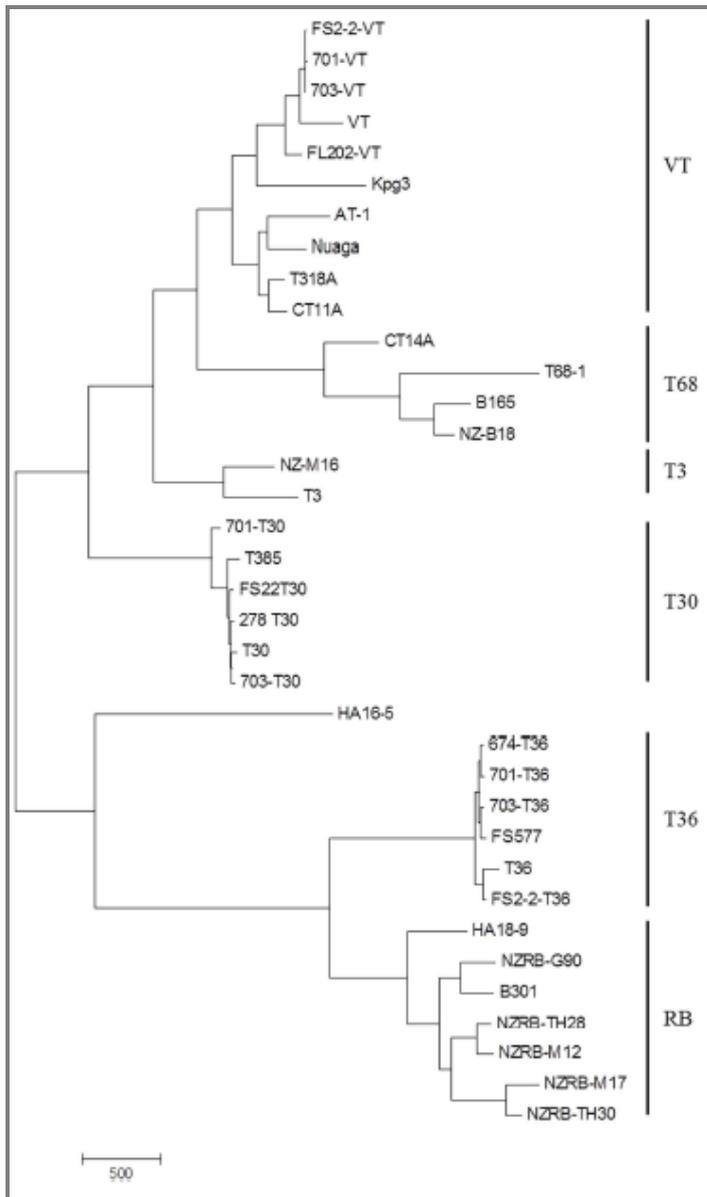


Figura 6. Árbol filogenético de Máxima Parsimonia realizado con genomas completos de CTV. Fuente: Harper, 2013.

1.3.7. Estrategias de control de CTV

El control de CTV, como el de cualquier otro virus, constituye un desafío continuo (Bar-Joseph et al., 1989). Se han diseñado varias estrategias de control cuyo abordaje dependerá: del grado de incidencia de CTV, la presencia y las especies de pulgones, la presencia de aislados severos del virus, las variedades de citrus y de portainjertos predominantes en la región, entre otros (Garnsey et al., 1998).

1.3.7.1 Control por cuarentena y exclusión

Los programas de cuarentena, saneamiento y certificación de material vegetal son medidas eficientes para evitar la presencia y/o dispersión de CTV en regiones cítricas libres del virus. Una vez que CTV ingresa a una región cítrica y es rápidamente detectado, o está presente en una región pero su dispersión es lenta y por tanto su incidencia es baja, la estrategia de control más adecuada son los programas de erradicación de árboles infectados (Gottwald et al. 2002, Bar-Joseph et al. 1989). Este tipo de medidas fueron tomadas en el Valle Central de California, EEUU (Dodds y Lee, 1991) y en Israel (Bar-Joseph et al., 1974) y, sin bien, redujeron la incidencia de CTV, fueron programas muy costosos que se discontinuaron y por lo tanto surgieron rebotes de la enfermedad, optando finalmente por el uso de portainjertos tolerantes (Cambra y Gorris 2003, Hall 1994).

1.3.7.2 Programas de saneamiento y certificación

El saneamiento y la certificación garantizan la autenticidad y sanidad del material vegetal, por lo tanto son medidas fundamentales para evitar la propagación del virus. La mayoría de los programas de saneamiento utilizan la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro et al., 1975). La misma consiste en aislar en condiciones asépticas, el ápice caulinar de un brote (meristemo apical más dos o tres primordios foliares subyacentes) y mediante injerto en T invertida colocarlo sobre un portainjerto, que es generado *in vitro* con semillas procedentes de árboles libres de patógenos. Esta técnica permite obtener plantas sin caracteres juveniles y libres de patógenos. El primer programa que generó material certificado de cítricos fue

desarrollado en California (EEUU) con el objetivo de obtener plantas libres de *Psorosis* (Calavan et al., 1978), y luego fue ampliado con las epidemias de tristeza en 1939. En Uruguay se desarrolló un programa de estas características en los años 90 que fue discontinuado y reiniciado en 2010, actualmente se exige la utilización de material certificado a todos los citricultores. Sin embargo, en zonas donde la tristeza y su vector son endémicos, como en nuestro país, las plantas liberadas de un programa de saneamiento y llevadas a campo seguramente serán re-infestadas en el corto plazo. Según Gottwald et al. (1996b), en presencia de *T. citricida* el virus se contrae en un par de años; por lo que este método por sí solo no constituye una herramienta de control para el virus.

1.3.7.3 Utilización de portainjertos resistentes

Sí la presencia del virus en una nueva región es acompañada por una alta tasa de dispersión debido a la presencia de sus vectores, la erradicación es inviable y se debe recurrir al uso de portainjertos resistentes para evitar el declinamiento por CTV (Moreno et al., 2010). Desde la aparición de la tristeza se ha estudiado el comportamiento de distintos pies frente a la infección por el virus, de modo de seleccionar aquellos que demostraran ser resistentes a la necrosis del floema en la zona del injerto. Así, resultaron como portainjertos resistentes a CTV: *P. trifoliata* y sus híbridos, Troyer y Carrizo citrange, *Swingle citrumelo*, *Lima Rangpur*, limón rugoso, Volkamer limón, y mandarina Cleopatra, quienes sustituyeron al NA en zonas endémicas de tristeza (Roistacher et al., 2010).

1.3.7.4 Protección cruzada

En áreas donde el virus y *T. citricida* son endémicos es posible encontrar aislados de CTV muy virulentos que si bien no provocan muerte de raicillas o declinamiento pueden limitar la producción (Roistacher 1988, Koizumi 1991, Broadbent et al. 1991). En Brasil la cepa 'Capão Bonito' ha causado importantes pérdidas económicas, especialmente en naranjos dulces injertados sobre lima Rangpur, desarrollando severo SP en la variedad y el portainjerto. En Sudáfrica algunas cepas provocan SP en limón rugoso y en Venezuela hay cepas que causan SP en limón

rugoso, limón volkameriano y mandarina Cleopatra (Rocha-Peña et al., 1995). Por esa razón, además de utilizar portainjertos resistentes, se recurre a programas de protección cruzada. Esta técnica consiste en pre-inocular plantas saneadas con un aislado “suave” del virus, previamente seleccionado, el cual impide la instauración de aislados más agresivos (Costa y Müller, 1980). La primera evidencia de protección cruzada en CTV ocurrió en forma natural en lima mexicana, en Brasil (Giacometti y Costa, 1958). Roistacher et al. (2010) menciona que los aislados suaves pueden ser encontrados en: a) árboles asintomáticos o con síntomas leves en sitios con expresión de síntomas severos, b) en plantas de lima mexicana que presenten reacciones leves en tests biológicos, c) en plantas de limón Eureka o NA que estuvieron amarillentas y luego se recuperaron, d) por atenuación de aislados severos al pasarlos a través de *Passiflora*. Müller y Costa (1968) seleccionaron un aislado protector para la naranja Pera en Brasil a partir de plantas que sobrevivían a la afección por tristeza. Este ha sido uno de los programas de protección cruzada más exitosos del mundo, a través del cual se han liberado más de 8 millones de plantas protegidas, y el aislado, luego de ser usado por más de 40 años, aún, continúa siendo efectivo (Costa et al., 2010). Actualmente, Sudáfrica, Australia, Brasil y Perú cuentan con este tipo de programas (Da Graça y Van Vuuren, 2010). En Sudáfrica los árboles de naranja Navel pre-inmunizados con aislados suaves, han logrado, en un lapso de 7 años, mayor desarrollo de planta y producción acumulada 47% superior frente a plantas saneadas sin inmunizar (Van Vuuren et al., 2009). La selección de cepas suaves para la protección cruzada es un proceso que se ha realizado históricamente de forma empírica. Actualmente, en base a experiencias pasadas y la información generada, se han establecido las bases para implementar programas de protección cruzada (Folimonova, 2013). No obstante, es difícil identificar aislados suaves y pueden generarse variantes genéticas en el virus que modifiquen la capacidad protectora del aislado seleccionado (Roistacher et al., 2010).

1.3.7.5 Resistencia genética

El desarrollo de materiales con resistencia sería el método más promisorio para el control de la enfermedad. Sí bien, se ha detectado resistencia a CTV en las especies: *P. trifoliata*, *Fortunella crassifolia* Swing., *C. grandis* (L.) Osbeck y *Citrus aurantium*, que son sexualmente compatibles con las especies del género *Citrus*, la obtención de materiales resistentes por cruzamientos convencionales es difícil por la compleja biología reproductiva de los cítricos (Mestre et al., 1997). Tampoco se han obtenido resultados consistentes con la generación de plantas transgénicas (Moreno et al., 2008).

1.4 SITUACIÓN DE CTV EN URUGUAY

1.4.1 El cultivo de cítricos en Uruguay

Los cítricos son el rubro de mayor importancia dentro del área hortifrutícola del país, representan aproximadamente el 1,1 % del producto bruto agrícola, generando un ingreso de 60 millones de dólares. El cultivo ocupa una superficie de 15340 ha, con 7,2 millones de plantas y una producción de 300 mil toneladas al año; de las cuales la mitad se exporta (DIEA, 2014). El sector cítrico se ha especializado en la producción de fruta fresca para mercado externo, siendo proveedor en "contra-estación" fundamentalmente para la Unión Europea. La región noroeste del país concentra el 88% de la superficie plantada y de la producción, abarcando los departamentos de Salto, Paysandú, Río Negro y Rivera; mientras que el sur concentra el 12 % restante, en los departamentos de Montevideo, San José, Canelones, Colonia y Maldonado. En lo que respecta a la composición por especies, el 51% son naranjas, 39% mandarinas 8% limones y 1% pomelos (DIEA, 2014). En la región norte hay un fuerte predominio de naranjas y mandarinas, mientras que en el sur de limones. Más del 90% de los montes están injertados sobre *Poncirus trifoliata* o sus híbridos, por ser tolerantes a bajas temperaturas y suelos pobres, y resistentes a *Phytophthora* y Tristeza.

La producción citrícola tiene un fuerte impacto social por su alta demanda de mano de obra, siendo fuente de empleo para unas 15000 personas. Además, en los últimos años ha tomado relevancia el procesamiento industrial de cítricos, como una actividad complementaria a la exportación, para captar los volúmenes de fruta no comercializados; se producen jugos concentrados, aceites esenciales y bases para pectinas.

Como rubro exportador, la cadena citrícola, es demandante de tecnologías y medidas de manejo que incrementen su producción en términos de volumen y calidad, siendo los problemas sanitarios una de las principales limitantes productivas.

1.4.2 El virus de la Tristeza en Uruguay

En nuestro país, la Tristeza es una enfermedad endémica y está presente su vector más eficiente *Toxoptera citricida* (Bentancour et al., 2009). A partir de 1930 esta enfermedad provocó la muerte de miles de plantas en plena producción injertadas sobre naranjo agrio. En 1955, Koch de Brotos y Boasso informaban acerca de una clara evidencia de la circulación de CTV en nuestro país. Parte de la solución a la enfermedad (muerte de árboles), fue la sustitución del portainjerto NA por los portainjertos trifoliados resistentes al patógeno. Actualmente un 90% de la citricultura del país utiliza *P. trifoliata* o sus híbridos (Citrangle, Carrizo y Troyer) como portainjerto, por lo que el síntoma típico de declinamiento está ausente. Sin embargo, en algunas regiones citrícolas del mundo, se han observado pérdidas de productividad en pomelos y ciertas variedades de naranjo dulce, aún cuando están injertados sobre portainjertos resistentes a Tristeza (Cambra y Moreno 2000, Bar-Joseph et al. 1989); debido a las acanaladuras que se producen en la madera, afectando el vigor de las plantas y el calibre de las frutas. En Uruguay, también se han observado acanaladuras en el tronco y ramas de pomelos y naranjos dulces, injertados sobre *P. trifoliata* (Muller y Campiglia, 1981) y fruta de calibre pequeño, síntomas que corresponderían a la presencia de aislados severos de CTV, los que podrían estar limitando el potencial productivo de las plantas cítricas y contribuyendo al descarte de frutos para exportación (por bajo calibre).

Por otra parte, en Nueva Zelandia se han reportado cepas de CTV que superan la resistencia de *P. trifoliata* (Harper et al. 2010, Dawson y Money 2000), con lo cual la dispersión de esa variante del virus sería una amenaza para nuestra citricultura.

En Uruguay desde el año 2010 se desarrolla el Programa Nacional de Saneamiento de Citrus, cuyo objetivo es la certificación genético-sanitaria de las plantas cítricas. Dentro de las enfermedades de propagación vegetativa consideradas se encuentra la tristeza, la cual es eliminada mediante la técnica del microinjerto. Sin embargo, la coexistencia del virus y el vector en el campo, no impiden que una planta saneada sea re-infectada en poco tiempo, por lo tanto el saneamiento por sí solo no contribuye al manejo de la enfermedad en nuestras condiciones. Se sabe que CTV, en condiciones de campo, se encuentra en la planta como una mezcla de aislados que difieren en sus propiedades biológicas (Garnsey et al., 2005) y agresividad y que, en ciertas circunstancias, aislamientos débiles protegen del efecto de los aislamientos severos. En regiones con una situación similar a la de Uruguay (portainjertos resistentes y presencia de *T. citricida*) se ha registrado la predominancia de aislamientos muy agresivos (Da Graça y Van Vuuren 2010, Roistacher et al. 2010) por lo que existe la potencial amenaza que la infección de las plantas saneadas en nuestras condiciones, sea con aislamientos severos. La solución a este problema sería la inoculación de las plantas “saneadas” previo a su liberación con aislamientos débiles locales con buena capacidad de protección. A esa medida se la conoce con el nombre de “protección cruzada” o “pre-inmunización” y es usada con éxito como método de manejo de la enfermedad en varios países citrícolas, como Japón, Brasil y Sudáfrica. El mecanismo de protección cruzada sería una alternativa interesante de manejo en nuestra situación; pero, para implementarla es necesario conocer las características de los aislados locales. Estudios previos indican que en Uruguay existen aislados de CTV con diferente agresividad (FAO, 1978), identificarlos, permitiría conocer si realmente existe un predominio de aislados severos y detectar aislamientos débiles, con interés potencial para su utilización en protección cruzada.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Caracterizar la severidad de aislados locales del virus de la Tristeza de los cítricos mediante pruebas biológicas y moleculares, de modo de detectar aquellos potencialmente útiles para la pre-inmunización de plantines de citrus.

1.5.2 Objetivos específicos

- 1-Determinación de la severidad de aislados de campo mediante bioensayos en plantas de referencia.
- 2- Caracterización de los aislados mediante técnicas moleculares

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS DE CTV

2.1.1 Aislamientos de CTV

En el estudio se incluyeron aislamientos de campo colectados en los años 1996-98, que fueron mantenidas en invernadero a prueba de insectos sobre limón rugoso en INIA SG y muestras colectadas en 2012. Los relevamientos se realizaron en las zonas norte y sur del país cubriendo las principales áreas citrícolas. En cada sitio de muestreo la búsqueda estuvo direccionada a localizar árboles con presencia de "stem pitting" (acanaladuras en tronco y/o ramas), pobre desarrollo y fruta pequeña, como posibles indicios de portar una cepa severa del virus. Simultáneamente, se seleccionaron árboles cercanos a éstos, que presentaban aspecto saludable, buen vigor y ausencia de acanaladuras como posibles hospederos de cepas suaves de CTV. Se recolectaron varetas de ambos tipos de árboles.

La infección por CTV fue confirmada mediante la prueba DAS-ELISA utilizando el kit Magic-DAS ELISA proveniente de Plant Print Diagnostics S.L. (Valencia, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. En esta técnica se utilizaron antisueros policlonales de conejo como tapizado y una mezcla de antisueros monoclonales ((3DF1+3CA5) conjugados con fosfatasa alcalina.

Para conservar los aislamientos seleccionados, trozos de corteza del material colectado fueron inoculadas mediante injerto en plantines de limón Rugoso o lima mexicana. En el cuadro 3 se presenta la información correspondiente a los 20 aislamientos utilizados.

Cuadro3. Aislamientos utilizados en el estudio.

Localidad	Variedad	Aislamiento	Código	Año Colecta	Aspecto del árbol en campo
SUR (San José)	Washington Navel	AD1	UY 16	1998	Sin vigor ("Chico")
		AD3	UY 17	1998	Normal ("Sano")
		AD6	UY 18	1998	Normal, SP moderado
	Satsuma	AD8	UY 19	1998	Normal ("Sano")
		AD10	UY 4	1998	Normal ("Sano")
		AD11	UY 20	1998	Fruta pequeña, SP severo
		AD12	UY 21	1998	Acentuada ausencia de vigor.
SUR (Canelones)	Limón	MO15	UY 2	1998	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Valencia	AZ1	UY 8	1998	Sin vigor ("Chico"), ramas secas
NORTE (Salto)	Valencia	CAP1	UY 12	2012	Normal ("Sano")
		CAP2	UY 5	2012	Normal ("Sano")
		CAP3	UY 13	2012	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Lane Late/Trifolio	SASA 1	UY 9	1997	Normal ("Sano")
		SAG 4	UY 14	1997	Normal ("Sano")
	Ortanique/Trifolio	SAG 6	UY 15	1997	Normal ("Sano")
		SACH 1	UY 11	1997	Sin vigor ("Chico") sin SP
	Lane Late/Trifolio	SACH 2	UY 7	1997	Sin vigor ("Chico"), sin SP
NORTE (Salto)	Pomelo Star Ruby	MILCH 1	UY 3	1997	Sin vigor ("Chico"), SP suave
	Satsuma Owari	MIL1	UY 22	2012	Buen porte y producción de fruta
NORTE (Salto)	Pomelo Marsh	CG 1	UY 6	1996	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Navel	FOR 1*	UY 10	2006	
SUR (San José)	Limón	TRU 7*	UY 23	1993	
NORTE (Salto)	Lima	T(-)**	UY 1	2006	

* Testigos positivos

**Testigo negativo

2.1.2 Bioensayos

La caracterización biológica se realizó según la metodología propuesta por Garsney, et al. (1987b). Se utilizó el set de cinco especies indicadoras: lima mexicana para observar aclaramiento de nervaduras y acanaladuras de la madera, naranjo agrio para evaluar “seedling yellows”, pomelo cv. Duncan para detectar acanaladuras de la madera y “seedling yellows”, naranjo dulce cv. Madame Vinous para apreciar clorosis y acanaladuras en la madera y la combinación naranjo dulce cv. Madame Vinous injertado sobre naranjo agrio para evaluar clorosis y enanismo, síntomas que revelarían daños en el floema a nivel de la zona de injerto y estarían asociados al declinamiento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Síntomas evaluados en cada indicadora*

Síntomas esperados	Indicadora				
	LM	PD	ND	NA	NA/ND
Aclaramiento de nervaduras =VC	x				
Hojas forma de cuchara = HC	x				
Nervaduras corchosas = VCK	x				
Enanismo =ST	x	x	x	x	x
Acanaladuras del tallo =SP	x	x	x		
Amarillamiento del plantín = SY		x		x	x
Clorosis = C			x		x
Declinamiento = DL					x

* LM: lima, PD: pomelo Duncan, ND: naranjo dulce, NA: naranjo agrio, NA/ND: naranjo dulce/agrio.

La producción de plantines de las distintas indicadoras se realizó a partir de semilla certificada, las que fueron sembradas en almacigueras con sustrato esterilizado. A los 20 días los plantines fueron transplantados, a macetas de 3 L conteniendo una mezcla esterilizada de turba y arena. Tres meses post-transplante, a la mitad de los plantines de NA fueron injertados con yemas de ND para constituir la indicadora ND/NA. Las plantas fueron mantenidas en un invernadero a prueba de insectos, durante 4-6 meses. La inoculación se realizó en junio de 2012, cuando los tallos de las plantas tenían un diámetro de entre 6-8 mm. Cada aislamiento a estudiar fue inoculado, mediante el injerto de dos trozos de corteza, en tres plantines de cada especie indicadora. La viabilidad del inóculo fue monitoreada visualmente por posibles fallas. Se utilizaron cuatro plantas como controles negativos y cuatro como controles positivos por indicadora, dos provenientes de un aislado local considerado “suave” y dos de un aislado severo (ambos utilizados en los tests biológicos del Programa Nacional de Certificación de Cítricos de Uruguay).

Dos meses luego de la inoculación las plantas fueron podadas, conducidas a una sola rama y se mantuvieron en invernadero con malla anti-áfidos a temperaturas entre 18 y 26 °C (con máximas de 35 °C en el verano), sugeridas como temperaturas óptimas para el desarrollo de síntomas de tristeza (Roistacher, 1991). Recibieron fertilización y tratamientos fitosanitarios semanalmente, especialmente dirigidos a evitar la presencia de ácaros e insectos.

La evaluación de síntomas se realizó en cada brotación ocurrida post-inoculación. Los síntomas foliares evaluados fueron: aclaramiento de nervaduras, hoja en forma de cuchara, presencia de nervaduras corchosas y clorosis. La presencia de “stem pitting” se evaluó al finalizar el test (10-12 meses post-inoculación), para ello se procedió al pelado de las ramas por encima de la zona de inoculación. El “stunting” fue evaluado visualmente y midiendo el crecimiento del plantín, tomando como punto inicial de crecimiento la zona de corte post-inoculación, y también se registró la presencia de epinastia y la reducción en el tamaño de las hojas de brotes nuevos. Las plantas que no mostraron síntomas claros de la infección por el virus durante el periodo de evaluación considerado fueron analizadas por DAS-ELISA. La severidad de cada síntoma se valoró según la siguiente escala: 0= sin síntomas, 1= síntomas leves, 2= s. moderados, 3= síntomas severos. El período de evaluación de síntomas estuvo sujeto a la obtención de los síntomas esperado en cada indicadora (Cuadro 5).

Cuadro 5. Periodo de evaluación de síntomas* para cada indicadora

Indicadora	Síntomas	Período de evaluación de síntomas				
		Meses pos-inoculación				
		2	4	6	10	12
Lima mexicana	VC,HC, Nck	x	x	x		
	SP				x	
Pomelo Duncan	SY		x	x		
	SP					x
Naranja dulce	SP					x
Naranja agrio	ST, SY		x	x		
N.dulce/N. agrio	C, NC, ST		x	x		
	DL					x

* VC: aclaramiento de nervadura o vein clearing, HC:hoja de cuchara, Nck: nervadura corchosa, SP: acanaladuras o stem pitting, SY: amarillamiento del platín o seedling yellows, C: clorosis, NC: nervadura clorótica, ST: enanismo, DL: declinamiento

2.1.3. Análisis de datos

El grado de severidad de cada aislamiento fue determinado calculando el valor promedio de cada síntoma observado en las tres repeticiones de cada indicadora al finalizar el indexaje. Luego, se creó un índice acumulativo para cada aislamiento que contemplara las observaciones obtenidas en todas las indicadoras. Para ello, el valor promedio del aislamiento en cada indicadora fue ponderado por un factor; que fue asignado a cada especie indicadora de acuerdo al impacto económico de los síntomas de CTV producidos en ellas (Garnsey et al., 1987b). Así, se estableció que en la lima mexicana el factor tuviera el valor de 1, en N.dulce/N.agrio valor 2, síntomas de seedling yellows en N. agrio 3, stem pitting en pomelo Duncan 4, y stem pitting en N. dulce, Madam Vinous, 5.

Finalmente, la severidad de los aislamientos en estudio fue determinada mediante la comparación de los índices acumulativos alcanzados y por el grupo al que corresponden según la clasificación de biotipos de CTV establecida a nivel mundial (Garnsey et al. 2005, Rocha-Peña et al. 1995). En este caso, el grupo es asignado de acuerdo a la correlación entre la sintomatología obtenida de cada aislamiento y la sintomatología de referencia para los 11 biotipos que conforman la colección mundial de CTV.

2.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE CTV

En este trabajo los aislamientos en estudio fueron analizados mediante la técnica RT-PCR, utilizando el protocolo de Iglesias et al. (2008). Se realizó la amplificación, secuenciación y análisis filogenético de tres regiones del genoma viral: P20 y P23 (regiones ligadas a la patogenicidad del virus) y P25 (región informativa a nivel filogenético).

2.2.1 Extracción de RNA viral

Se colectaron 100 mg de tejido vegetal fresco (hoja) por muestra a analizar, se homogeneizaron con nitrógeno líquido y se agregó 1 ml de buffer TRI (Tiocinato de

guanadina: 23,7 g, Citrato de sodio: 100 mM, Sarcosyl: 0.25 g, β -mercapto EtOH: 340 μ l, fenol ARN: 50 ml, 10 mL acetato-K 2M: 10 ml), se incubó la muestra a temperatura ambiente por 3-5'; luego se centrifugó a 4 °C y 12000 rpm durante 10', se extrajo el sobrenadante a un tubo eppendorf estéril y se incubó a 30 °C por 5'. Posteriormente, se añadieron 0,2 ml de cloroformo, se agitó manualmente y se incubó a temperatura ambiente por 3', luego se centrifugó a 4 °C y 12000 rpm por 15' y se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo. Finalmente, se precipitó el ARN con 0,125 ml del buffer HSPB (0,8 M Citrato de sodio y 1,2 M de NaCl) y 0,125 ml de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 10', se centrifugó a 4 °C y 12000 rpm durante 10' y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido se lavó con EtOH 70% y se resuspendió en 40 μ l de agua DPEC; el ARN total extraído fue cuantificado por espectrofotometría y conservado en freezer a -80 °C.

2.2.2. Síntesis del cDNA

El ADNc se sintetizó utilizando 2 μ g de ARN, 0,5 μ l de random primers (10 μ M) y agua estéril para completar el volumen final; la mezcla fue incubada por 5' a 95 °C y por 4' en hielo. Luego se incorporó a cada tubo 3,75 μ l de la mezcla compuesta por : 2 μ l de buffer RT (10X), 1 μ l de dNTP (10 mM), 0,25 μ l de Inhibidor de RNAsas (Ribolock, Thermo Scientific) y 0,5 μ l de M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/uL), finalmente se colocó en el termociclador.

2.2.3. RT-PCR

La amplificación de las secuencias correspondientes a los genes p20, p23 y p25 se realizó mediante la técnica de PCR en un solo paso. La solución para un volumen final de 25 μ l estuvo constituida por: 2 μ l de cDNA, 2,5 μ l de buffer, 1 μ l de cada primer, 2 μ l de MgCl₂, 0,7 μ l de dNTP, 18,4 μ l de agua y 0,4 μ l de Taq Polimerasa. Los primers utilizados para amplificar los genes p20, p23 y p25 se detallan en el cuadro 6. El programa para la amplificación de los tres genes se especifica en el cuadro 7. El producto de la amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%, teñidos con el colorante GoodView™ (SBS Genetech Co. Ltd., China) y observados en transiluminador bajo luz ultravioleta (UV).

Cuadro 6. Primers utilizados para la amplificación de los genes p20, p23 y p25 de CTV.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de banda	Referencias
p25F	TGAATTATGGACGACGAAAC	677pb	Iglesias <i>et al.</i> , 2008
p25R	TCAACGTGTGTTGAATTTCCC		
p20F	ACAATATGCGAGCTTACTTTA	561pb	Rubio <i>et al.</i> , 2001
p20R	AACCTACACGCAAGATGGA		
PM50	ACTAACTTTAATTGGAACA	697pb	Sambade <i>et al.</i> , 2003
PM51	AACCTATTCCGTCCACTTC		

Cuadro 7. Condiciones de ciclado para los genes p20, p23 y p25.

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

2.2.4. Purificación de los productos de PCR

Los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando el kit “*AxyPrep DNA Gel Extraction*” (Axygen Inc., EEUU), según recomendaciones del fabricante. La purificación de los productos fue visualizada en geles de agarosa en las condiciones mencionadas anteriormente.

2.2.5. Secuenciación de los productos de PCR

La secuenciación se realizó de forma automática en la Unidad de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. La secuenciación de los amplicones se realizó en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5'), utilizando para cada gen los primers específicos utilizados para la amplificación.

2.2.6. Alineamiento de secuencias

Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa SeqMan (Lasergene, DNASTAR). Los alineamientos se realizaron con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6.0 (MEGA 6.0) a través del método Clustal W. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de CTV consideradas de referencia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos del GenBank accesible en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>, Cuadro 8).

Cuadro 8. Secuencias nucleotídicas de referencia mundial disponibles en la base de datos internacional GenBank.

Acrónimo	Origen	No. Acceso GB	Clasificación del aislado por severidad
T30	EE.UU.	EU937520	
T385	España	Y18420	Débiles
C268-2	Argentina	AY750748 (p23), AY750770 (p25)	
T3	EE.UU.	KC525952	
T68-1	EE.UU.	JQ965169	
VT	Israel	U56902	
SY568	EE.UU.	AF001623	
NZ-M16	Nueva Zelanda	EU857538	
NZ-B18	Nueva Zelanda	FJ525436	Severos
NUagA	Japón	AB046398	
C269-6	Argentina	AY750750 (p23), AY750775 (p25)	
C270-3	Argentina	AY750751 (p23), AY750779 (p25)	
Barao B	Brasil	AJ579775 (p23), FM956000 (p20)	
T36	EE.UU.	U16304	
Qaha	Egipto	AY340974	RB (<i>resistence breaking</i>)
Mexico	México	DQ272579	
NZRB-G90	Nueva Zelanda	FJ525432	

2.2.7. Análisis filogenéticos

Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 6.0 utilizando el método de Neighbor Joining (NJ) con el modelo Kimura 2 Parámetros (K2P) y 1000 seudoréplicas de apoyo estadístico.

3. RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

En los bioensayos todos los aislados produjeron los síntomas esperables en las distintas indicadoras, con variabilidad en el grado de expresión de los mismos. En LM se observó aclaramiento de nervaduras, hojas “cuchara” y nervadura corchosa a los dos meses pos-inoculación, así como acanaladuras en la madera al finalizar la prueba (1 año) (Figura 7). En el resto de las indicadoras los síntomas se manifestaron a los cuatro y seis meses luego de la inoculación. En los plantines de NA y PD se observó amarillamiento del plantín y enanismo (Figuras 8 y 9), en ND/NA algunos aislados manifestaron clorosis en la nervadura central de la hoja, clorosis foliar y enanismo (Figura 10) y en ND y PD, al año de la inoculación, se observaron distintos grados de acanaladuras en la madera (Figuras 9 y 11). Algunos aislados también produjeron nervaduras corchosas, epinastias, brotes múltiples y fuerte reducción del crecimiento.

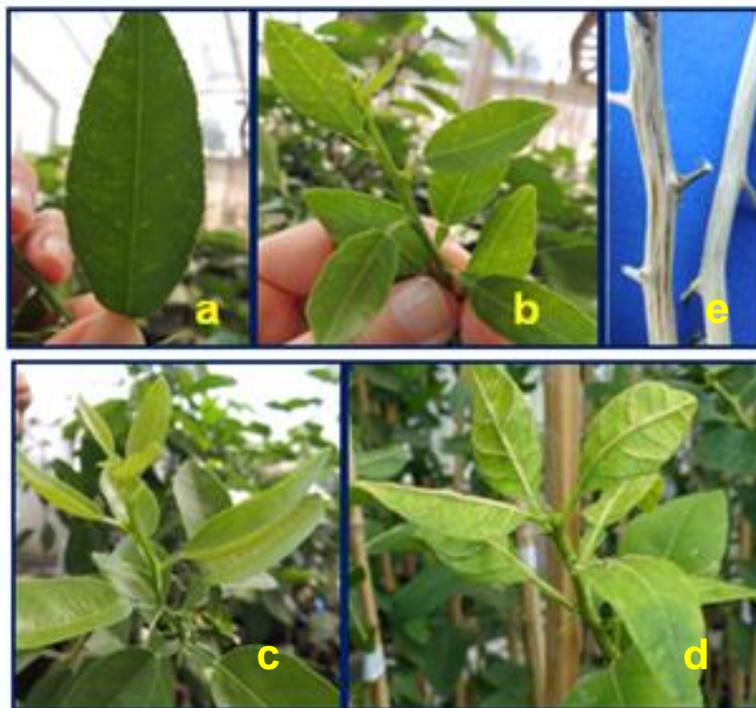


Figura 7. Síntomas observados en lima mexicana: a y b) aclaramiento de nervaduras, c) hojas en forma de cuchara, d) nervaduras corchosas, e) acanaladuras (SP).

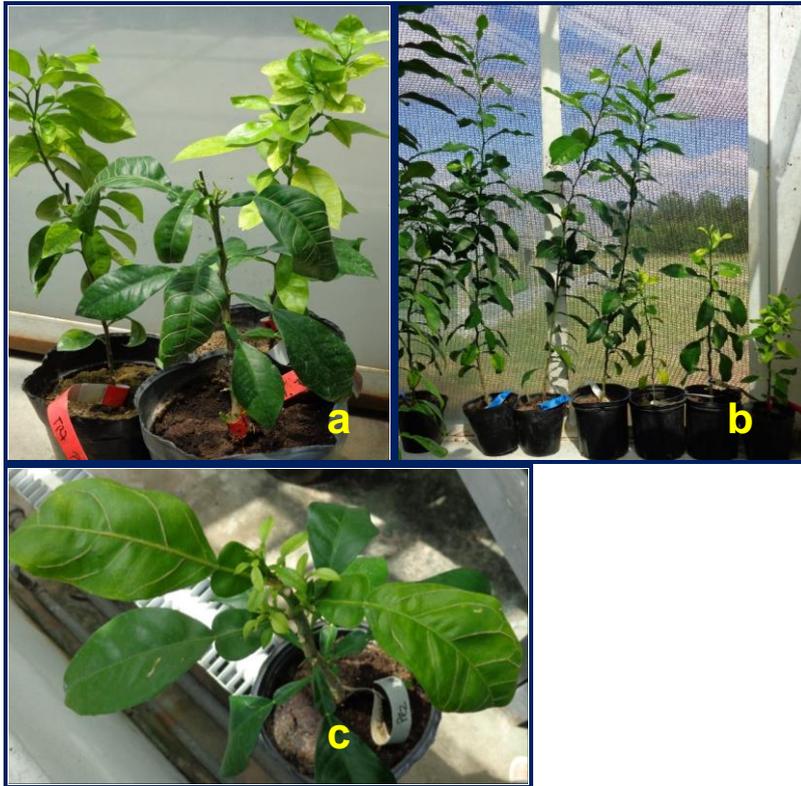


Figura 8. Síntomas en N. Agrio: a) amarillamiento del plantín (SY), b) plantines normales (izquierda) y plantines con SY (derecha), c) nervaduras corchosas y brotes múltiples.

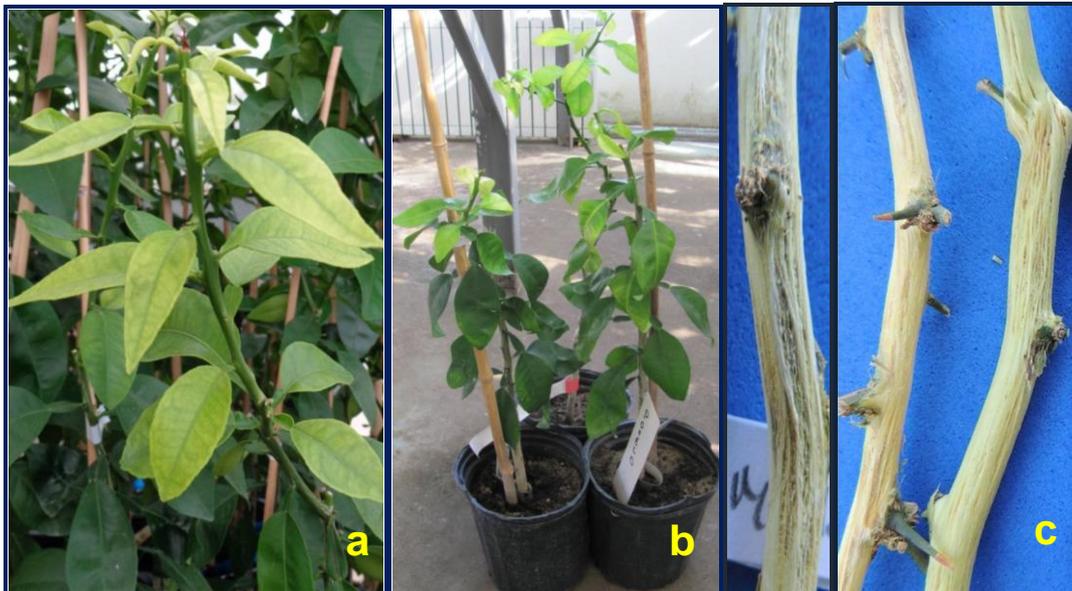


Figura 9. Síntomas en Pomelo *Duncan*: a) clorosis, b) amarillamiento del plantín, c) acanaladuras (SP).



Figura 10. Síntomas en N. Dulce/N. Agrio: a) vena principal clorótica, clorosis y retraso de crecimiento.



Figura 11. Síntomas en N. Dulce: a) clorosis, b) acanaladuras (SP).

En cada indicadora evaluada fue posible observar una amplia gama de síntomas para los veinte aislados en estudio (Cuadro 9). En LM, sí bien todos los aislados produjeron síntomas, algunos solo manifestaron aclaramiento de nervadura, mientras otros evidenciaban fuerte enanismo, acentuada presencia de hojas en forma de “cuchara” y nervaduras corchosas. En NA el síntoma de amarillamiento del plantín (“seedling yellows”), típico de esta indicadora, se produjo en el 70% de los aislados, siendo su nivel de severidad mayoritariamente moderado o severo. Por otra parte, la

mitad de los aislados generaron clorosis foliar y enanismo en ND/NA y la mayoría de ellos presentó leve o moderada clorosis en la nervadura central de la hoja, síntomas asociados al declinamiento (DL). Además, el 85% de los aislados en estudio generó algún grado de SP en pomelo y ND, el mismo se manifestó como “pequeños pinchos” en ND en concordancia con lo reportado por Garnsey et al. (2005) y generalmente como las acanaladuras típicas en pomelo.

Cuadro 9. Síntomas producidos* por los distintos aislamientos en cada indicadora, según escala de severidad **.

Localidad	Variedad	Aislamiento	Código	Indicadora													
				Lima mexicana					N.dulce/N.Agrío				N.Agrío		Pomelo		N.dulce
				VC	HC	Vck	SP	ST	NCI	ST	C	DL	SY	SY	SP	SP	
Salto	Valencia	CAP1	UY 12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Salto	Valencia	CAP3	UY 13	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Paysandú	Navel	SAG4	UY 14	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Salto	Valencia	CAP2	UY 5	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	+	+	-
San José	Satsuma	AD12	UY 21	++	+	-	++	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Canelones	Limón	MO15	UY 2	++	++	-	+++	+	-	-	-	-	-	-	+	+++	+
Salto	Pomelo	MILCH	UY3	+	+	-	+++	-	+	-	+	-	-	-	-	++	+
Salto	Pomelo	CG1	UY6	++	+	-	+++	-	+	++	+	++	-	-	++	+	+
San José	Navel	AD6	UY 18	++	++	-	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++
San José	Navel	AD8	UY 19	++	++	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++	+	+
San José	Navel	AD3	UY 17	+	++	-	+++	-	+	+	-	+	+++	+	+	+	+
San José	Navel	AD11	UY 20	+++	+	-	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+	+	+
San José	Navel	AD10	UY 4	+	++	-	+++	-	+	++	+++	++	++	+	+	++	+
San José	Navel	AD1	UY 16	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
Paysandú	Navel	SACH2	UY 7	+	+	-	+++	-	+	+++	+++	+++	++	+++	+	++	++
Paysandú	Navel	SASA1	UY 9	+	+	+	+++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	++	++
Paysandú	Ortanique	SAG6	UY 15	++	++	-	+++	-	+	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
Paysandú	Navel	SACH1	UY 11	+	+	-	+++	-	+	++	++	++	+++	+++	++	++	++
Paysandú	Valencia	AZ1	UY 8	+	+	+	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
Salto	Satsuma	MIL	UY 22	+	-	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
		TR7	UY23	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+++	-	-	-	-
	Testigos	FOR 1	UY 10	-	+	+	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++	+++
		Testigo neg.	UY 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: VC: aclaramiento de nervaduras (vein clearing), HC: hojas en forma de cuchara, Vck: nervaduras corchosas (vein corking), ST: enanismo (stunting), SP: acanaladuras (stem pitting), NCI: nervadura clorótica, C: clorosis foliar, DL: declinamiento (clorosis y enanismo), SY: amarillamiento del plantín (seedlings yellows).

** Escala de severidad de síntomas: - ausencia, + síntomas leves, ++ moderados, +++ severos.

Según las respuestas observadas durante la caracterización biológica, en expresión y severidad de síntomas, fue posible agrupar aislados que compartían ciertas reacciones (Cuadro 9). Dos aislados produjeron síntomas leves en LM y alguna otra indicadora, por lo que podrían considerarse como poco virulentos. Otro grupo (15% de los aislados) manifestó síntomas leves en LM y otras indicadoras y leve SP en ND y pomelo. Un tercer grupo (40% de los aislados) generó síntomas moderados a severos en LM, presentó algunas reacciones de SY en NA, así como de clorosis foliar y enanismo en ND/NA, SP moderado en pomelo y leve en ND. El último grupo (35% de los aislados) presentó síntomas moderados y severos en todas las indicadoras, son aislados que provocaron fuertes reacciones de SY en NA y pomelo, acentuado enanismo y clorosis foliar (declinamiento) en ND/NA, SP moderados a severos en pomelo y ND, restricciones de crecimiento y nervaduras corchosas en varias indicadoras.

Sí consideramos los índices acumulativos de cada aislado, generados por la sumatoria del nivel de severidad de los síntomas expresados en las distintas indicadoras y ponderados por un factor de impacto económico (Garnsey et al., 1987b), obtenemos una clasificación similar a la anterior (Cuadro 10), donde, en nuestras condiciones, el síntoma más importante para separar grupos es la producción de SP, sobretodo en ND.

Cuadro 10. Índice acumulado de síntomas por aislamiento en las distintas indicadoras¹

Aislamiento	Código	LM*	ND/NA*2	NA*3	PD*4	ND*5	Acumulado
CAP1	UY 12	1,0	0	0,9	0	0	1,9
CAP3	UY 13	1,8	1	0	0	0	2,8
SAG4	UY 14	4,0	0	0	0	5	9,0
CAP2	UY 5	1,9	0	6	4	0	11,9
AD12	UY 21	9,6	0	0	1,2	1,5	12,3
MILCH	UY 3	10,1	0	0	6,4	3	19,5
CG1	UY 6	13,3	4	0	6,4	1,5	25,2
MO15	UY 2	14,7	0	0	12	3	29,7
AD6	UY 18	13,8	2	3	4	8	30,8
AD8	UY 19	12,6	0	6	8	5	31,6
AD3	UY 17	12,5	2	9	4	5	32,5
AD11	UY 20	12,8	6	9	4	3	34,8
AD1	UY 16	8,3	3	1,8	8	15	36,1
AD10	UY 4	13,0	5	6	8	6,5	38,1
SACH1	UY 11	11,0	5	9	9,2	8	41,8
SAG6	UY 15	12,8	6	6	8	10	42,8
SASA1	UY 9	17,5	5	4,8	8	8	43,3
AZ1	UY 8	18,5	4	9	10,4	8	49,9
MIL	UY 22	20,0	6	9	8	13	56,0

1: LM: síntomas foliares y SP ponderados por 1, ND/NA: declinamiento ponderado por 2, NA: reacción de SY ponderada por 3, PD: SP ponderado por 4, ND: SP ponderado por 5.

Por otra parte, existió poca relación entre los síntomas generados en las indicadoras y el aspecto del árbol en campo del que se colectaron las muestras (Cuadro 11). De las veinte muestras en estudio, 12 fueron colectadas de árboles con aspecto normal en campo, sin embargo solo un 40% de ellas dio síntomas leves en las indicadoras, el resto (60%) dio SP moderado en PD y ND y reacción de SY en NA, por lo tanto, éstos árboles a pesar de su aspecto saludable eran portadores de variantes severas de CTV. Asimismo, aislados que se obtuvieron de árboles con fruta pequeña no manifestaron SP como sería esperable, aunque sí dieron reacción severa de SY en NA. Sin embargo, la mayoría de los aislados provenientes de árboles con ausencia de vigor (árboles más pequeños que la media) mostraron SP moderado o severo en PD y/o ND y SY en NA, aunque uno de estos aislados generó síntomas leves en las

indicadoras, por lo que la falta de vigor en ese caso podría atribuirse a otra causa (infección con viroides, comprobada posteriormente) y no a cepas severas de CTV. El aislado MIL se obtuvo de una planta destacada en campo, de buen porte y producción, sin embargo dio reacciones severas en todas las indicadoras. Los aislados de pomelo y limón generaron SP moderado y severo en PD, aunque sólo uno de ellos (MILCH) presentaba ausencia de vigor en campo. En cambio, los aislados provenientes de naranjas han provocado SP leve o moderado en ND, aunque también produjeron síntomas en pomelo y NA.

Cuadro 11. Aspecto del árbol en campo y síntomas generados en las indicadoras

Localidad	Variedad	Aislamiento	Código	Aspecto del árbol en campo*	Síntomas en indicadoras		
					N.Agrío	Pomelo	N.dulce
					SY	SP	SP
Salto	Valencia	CAP1	UY 12	Normal	+		
Salto	Valencia	CAP3	UY 13	Normal			
Paysandú	Navel	SAG4	UY 14	Normal			+
Salto	Valencia	CAP2	UY 5	Normal	++	+	
San José	Navel	AD3	UY 17	Normal	+++	+	+
San José	Navel	AD8	UY 19	Normal	++	++	+
San José	Navel	AD10	UY 4	Normal	++	++	+
Salto	Pomelo	CG1	UY 6	Normal		++	+
Canelones	Limón	MO15	UY 2	Normal		+++	+
San José	Navel	AD6	UY 18	Normal	+	+	++
Paysandú	Navel	SASA1	UY 9	Normal	++	++	++
Paysandú	Ortanique	SAG6	UY 15	Normal	++	++	++
San José	Navel	AD11	UY 20	Fruta pequeña	+++	+	+
Salto	Satsuma	MIL	UY 22	Buen porte y producción	+++	++	+++
San José	Satsuma	AD12	UY 21	Ausencia de vigor**		+	+
Salto	Pomelo	MILCH	UY 3	Ausencia de vigor		++	+
Paysandú	Navel	SACH2	UY 7	Ausencia de vigor	++	+	++
San José	Navel	AD1	UY 16	Ausencia de vigor	+	++	+++
Paysandú	Navel	SACH1	UY 11	Ausencia de vigor	+++	++	++
Paysandú	Valencia	AZ1	UY 8	Ausencia de vigor	+++	+++	++

* Aspecto del árbol al momento de colectar la muestra

** Árboles más pequeños que la media del cuadro, en algún caso con ramas secas

En cuanto a la clasificación en los grupos biológicos establecidos por Garnsey et al. (2005) (Figura 4) los resultados se resumen en el cuadro 12. Estos grupos son conformados según los síntomas producidos por cada aislado en el conjunto de indicadores, sin guardar relación con el grado de severidad. En general se pudo correlacionar la respuesta obtenida por cada aislado con un determinado grupo biológico, excepto en siete casos donde estos aislados no reúnen todas las características de los grupos establecidos pues faltó la reacción en alguna de las indicadores; no obstante, se ha mencionado que algunos aislados pueden no quedar contemplados en estos grupos (Garnsey et al., 2005). Como se observa sólo un aislado clasificó en el grupo I, poco virulento, con síntomas únicamente en LM; 40% de los aislados se correspondieron con el grupo V expresando síntomas en todas las indicadores; un aislado perteneció al grupo VII sin reacción de SY en NA y otros al grupo VIII sin respuesta en ND/NA, ambas reacciones (SY y DL) fueron las menos frecuentes en este estudio.

Cuadro 12. Clasificación de los aislados en grupos biológicos según el patrón de síntomas observados.

Biotipo	Aislado	Código	Reacción en las Indicadoras *				
			Lima	ND/NA	N. Agrio	Pomelo	N.dulce
			SV	DL	SY	SP	SP
I	CAP3	UY 13	x	0	0	0	0
III ₁	CAP1	UY 12	x	0	x	0	0
IV ₂	CAP2	UY 5	x	0	x	x	0
V	AD11	UY 20	x	x	x	x	x
V	AD6	UY 18	x	x	x	x	x
V	SACH2	UY 7	x	x	x	x	x
V	SASA1	UY 9	x	x	x	x	x
V	SAG6	UY 15	x	x	x	x	x
V	AD10	UY 4	x	x	x	x	x
V	AZ1	UY 8	x	x	x	x	x
V	MIL	UY 22	x	x	x	x	x
V ₃	AD1	UY 16	x	0	x	x	x
V ₃	AD8	UY 19	x	0	x	x	x
V ₃	SACH1	UY 11	x	0	x	x	x
V ₃	AD3	UY 17	x	0	x	x	x
VII	CG1	UY 6	x	x	0	x	x
VIII	MILCH	UY 3	x	0	0	x	x
VIII	MO15	UY 2	x	0	0	x	x
VIII	AD12	UY 21	x	0	0	x	x
VIII ₄	SAG4	UY 14	x	0	0	0	x

(*) SV: síntomas foliares y acanaladuras en LM, DL: declinamiento en ND/NA evaluado como presencia de clorosis y enanismo, SY: amarillamiento del plantín (seedlings yellows) en NA, SP: acanaladuras (stem pitting) en pomelo y ND.

1, 2 y 3: los aislados podrían pertenecer a esos biogrupos pero falta la reacción DL (declinamiento) en ND/NA.

4: podría pertenecer al biogrupo VIII, pero falta el síntoma SP en pomelo

3.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Para cada gen estudiado, las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante árboles filogenéticos junto a las secuencias de referencia obtenidas de la base de datos GenBank (Cuadro 8). Se consideró la clasificación propuesta por Harper (2013), quién determinó la existencia de seis líneas de CTV: VT, T30, T3, RB, T36, T68 (Figura 6) y una posible nueva línea constituida por el aislado HA16-5, cada uno de estos genotipos se corresponde con un clado. Para la separación de clusters se consideraron valores de bootstrap superiores a 70%.

Para la región del gen p25 se analizaron 18 secuencias de Uruguay, con una longitud de 561 pb. Se obtuvo un árbol con 7 clados definidos y con alto soporte estadístico (Figura 12). Las secuencias del genotipo T36, T30 y T68 agruparon con valores de bootstrap de 100% y no hay secuencias uruguayas dentro de estos clados. El clado del genotipo VT tuvo un apoyo estadístico de 95% y las secuencias 17 y 18 agruparon allí, con la secuencia NZ-M16 (recombinante). Las secuencias 11 y 20 agruparon con las secuencias de referencia del genotipo RB con un soporte estadístico de 69. El 62% de las secuencias uruguayas estudiadas se incluyeron en el nuevo clado (NC) descrito por Benítez-Galeano et al. (2015), junto a secuencias argentinas y la de Hawaii (HA 16-5) con un valor de bootstrap de 87%.

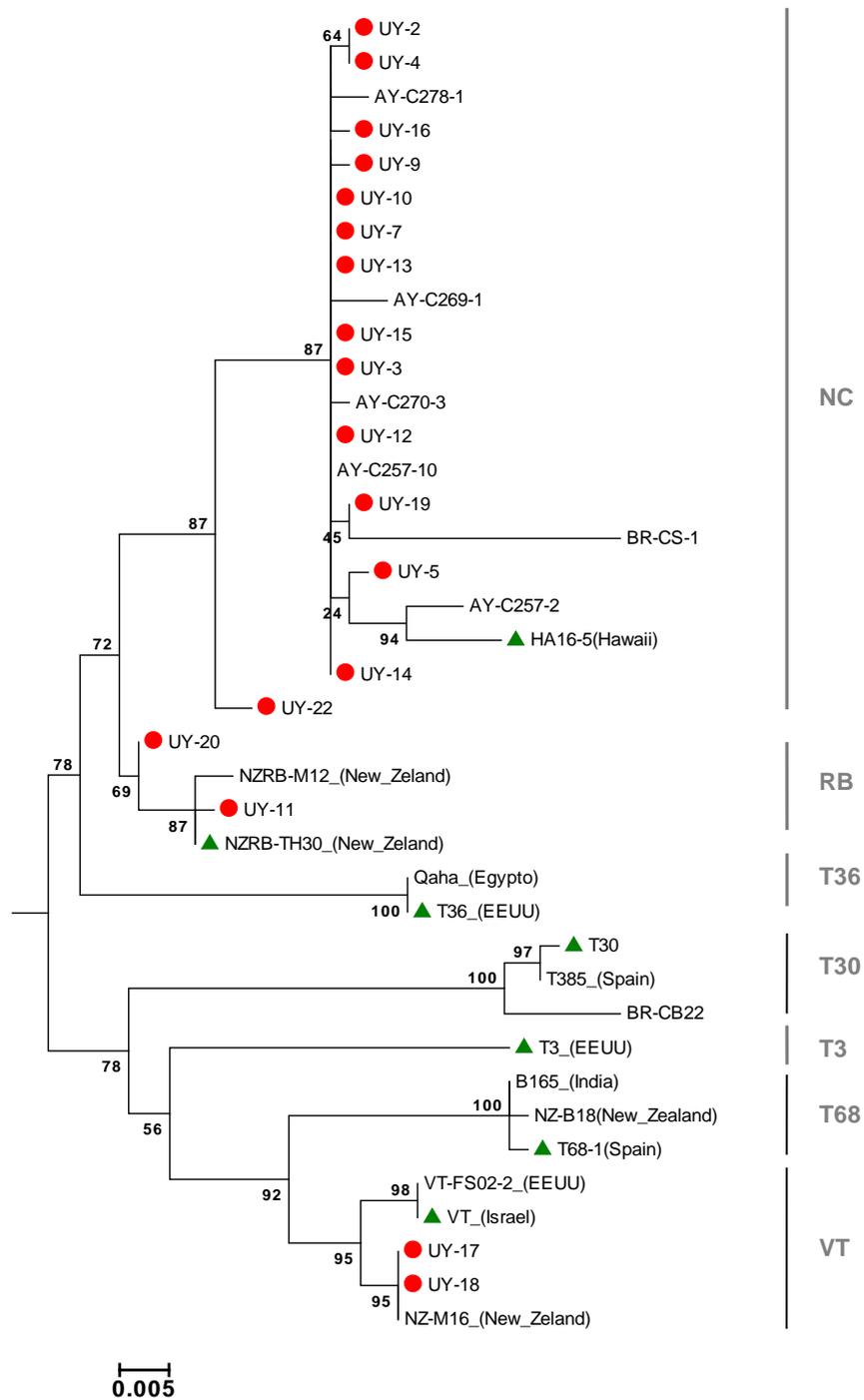


Figura 12. Árbol filogenético para el gen p25.

● Secuencias uruguayas, ▲ Genotipos de referencia, AY: secuencias argentinas, BR: secuencias brasileras.

Con respecto al gen p20, se analizaron un total de 12 secuencias uruguayas de 411pb. El árbol presentó 7 clados muy claramente definidos y con altos valores de bootstrap (Figura 13). Los clados T30 y T36, con apoyo estadístico del 100%, no incluyeron secuencias uruguayas. Los clados de los genotipos T68 y RB, con bootstrap de 80 y 88% respectivamente, tampoco incluyeron aislados uruguayos. Las muestras 17 y 18 agruparon con las secuencias de referencia del genotipo VT con un soporte estadístico de 97% y la muestra 2 agrupó dentro del NC con apoyo de 99%. El 45% de las secuencias uruguayas analizadas para este gen perteneció al cluster del genotipo T3 con un bootstrap de 68%.

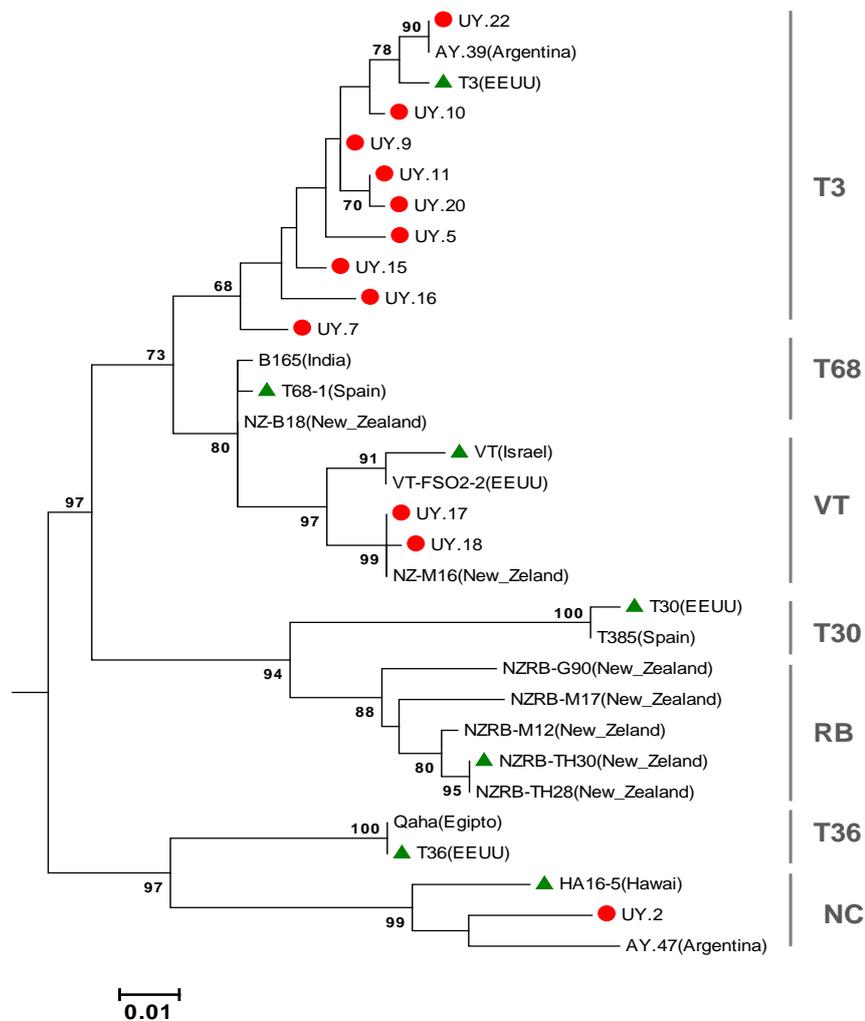


Figura 13. Árbol filogenético para el gen p20.

● Secuencias uruguayas, ▲ Genotipos de referencia, AY: secuencias argentinas, BR: secuencias brasileras.

En cuanto al gen p23, el árbol filogenético fue construido con 16 secuencias uruguayas de 528pb. Se observaron 7 clados definidos (Figura 14). Los clados de los genotipos T30 y T36, con bootstrap de 98 y 100% respectivamente, no incluyeron aislados uruguayos. Las muestras 17, 18, 19 y 21 se agruparon dentro del clado VT, con la secuencia NZ-M16 (recombinante), con 99% de apoyo estadístico. Tres aislados uruguayos estuvieron incluidos en el clado del genotipo T68 con 90% de soporte; la muestra 5 no se puede clasificar, aunque está más cercana a los genotipos VT y T68. El 33% de las muestras analizadas para este gen se asociaron con secuencias de referencia del genotipo T3. No se observaron, para p23, muestras uruguayas en el clado NC (genotipo HA 16-5).

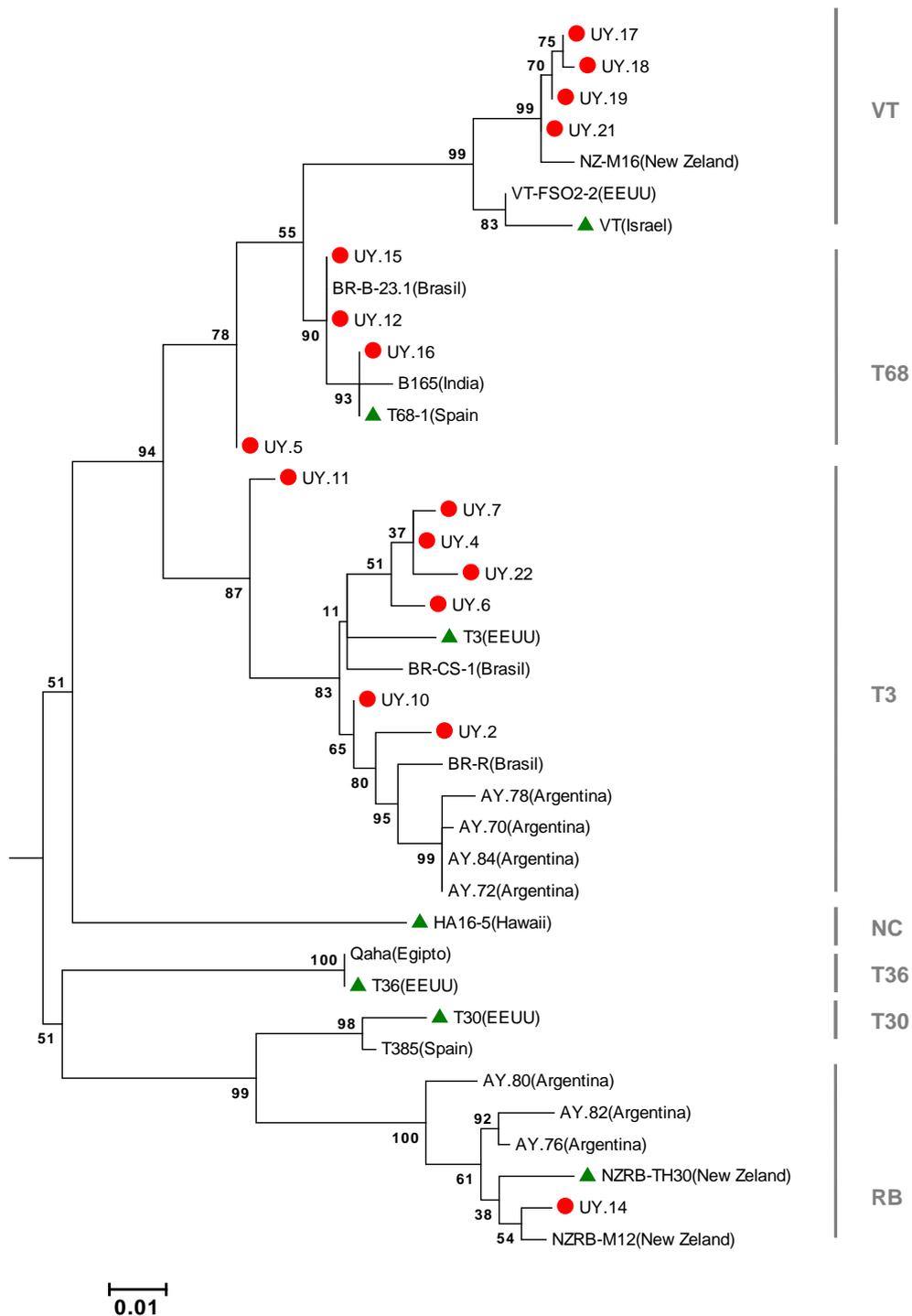


Figura 14. Árbol filogenético para el gen p23.

● Secuencias uruguayas, ▲ Genotipos de referencia, AY: secuencias argentinas, BR: secuencias brasileras.

Sambade et al. (2003) agrupó molecularmente los aislados según virulencia en: suaves, intermedios y severos (Figura 5), esta clasificación se puede correlacionar con la nueva clasificación de Harper (2013) de la siguiente manera: el genotipo T30 corresponde a aislados suaves, el T36 a los de virulencia intermedia y los genotipos VT, T68, RB y T3 estarían agrupando aislados severos (Biswas et al., 2012). Según la clasificación propuesta por Sambade et al. (2003) nuestros aislados agrupan con aislados severos inductores de SP en ND o PD, o forman un clado aparte de los aislados de referencia internacional (Figura 15).

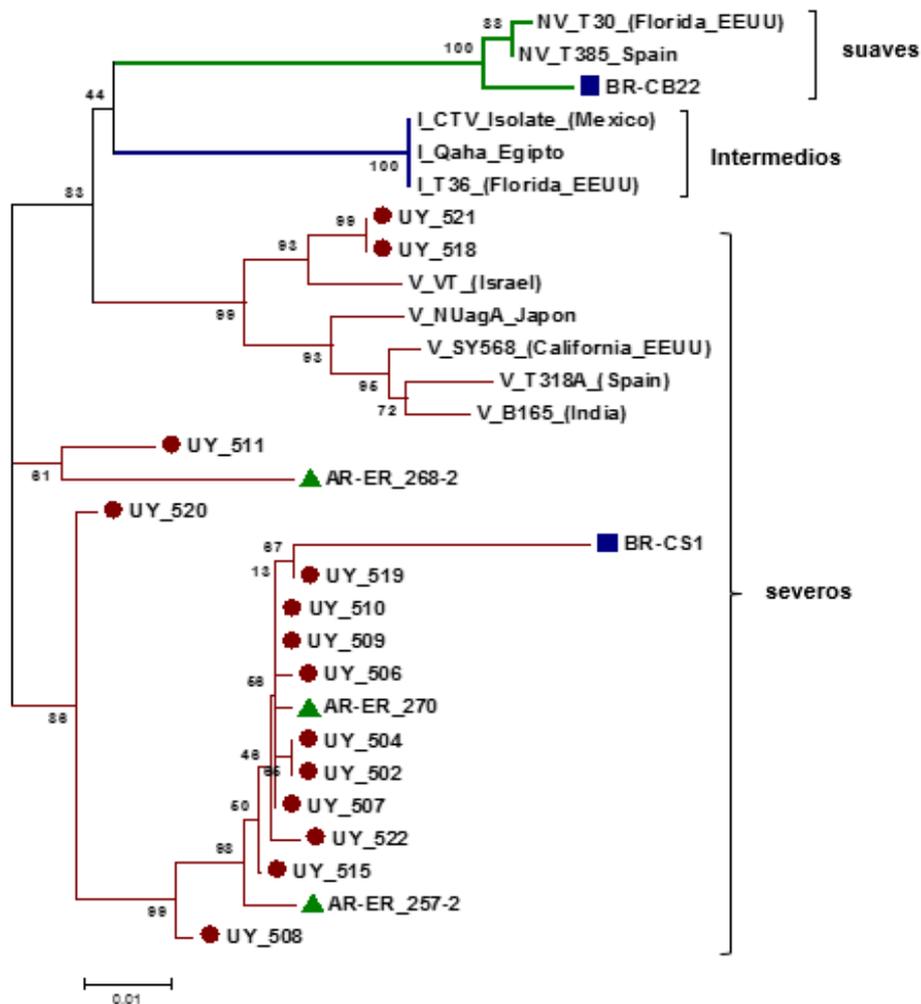


Figura 15. Árbol filogenético para el gen p25, según clasificación propuesta por Sambade et al. (2003)*.

● Secuencias uruguayas, ▲ Secuencias argentinas, ■ Secuencias brasileras.* El código de las secuencias uruguayas está precedido por un _5 indicando que corresponde al gen p25.

En el cuadro 13 se detalla un resumen de los genotipos inferidos a partir de los árboles filogenéticos de los aislados uruguayos para los genes p20, p23 y p25. La población viral dentro de cada muestra presenta diferentes genotipos, siendo los que aparecen con mayor frecuencia NC y T3, genotipos que fueron descriptos recientemente (Benítez-Galeano et al. 2015, Harper 2013), pero que circulan en el país desde hace muchos años.

Cuadro 13. Genotipos de los aislados uruguayos para los genes p20, p23 y p25*.

Aislamiento	Código	P20	P23	P25
MO15	UY 2	NC	T3	NC
MILCH 1	UY 3	x	x	NC
AD 10	UY 4	x	T3	NC
CAP 2	UY 5	T3	T68?	NC
CG 1	UY 6	x	T3	xx
SACH 2	UY 7	T3	T3	NC
AZ	UY 8	xx	xx	xx
SASA 1	UY 9	T3	x	NC
FOR 1	UY 10	T3	T3	NC
SACH 1	UY 11	T3	T3	RB
CAP 1	UY 12	xx	T68	NC
CAP 3	UY 13	xx	x	NC
SAG 4	UY 14	xx	RB	NC
SAG 6	UY 15	T3	T68	NC
AD 1	UY 16	T3	T68	NC
AD 3	UY 17	VT	VT	VT
AD 6	UY 18	VT	VT	VT
AD 8	UY 19	xx	VT	NC
AD 11	UY 20	T3	xx	RB?
AD 12	UY 21	x	VT	xx
MIL	UY 22	T3	T3	NC

* x: no amplificó

xx: no se obtuvo secuencia de buena calidad

?: probablemente pertenezca a ese genotipo

4. DISCUSIÓN

En los bioensayos se observó una amplia gama de síntomas en las distintas indicadoras. Garsney et al. (2005) mencionan que la expresión de síntomas por CTV es diversa y compleja y que cada aislado puede diferir marcadamente de otro en la severidad de los síntomas inducidos y en la habilidad para causar síntomas en diversos hospederos. En nuestro estudio todos los aislados produjeron los síntomas esperables en al menos dos indicadoras, pero la mayoría de ellos reaccionó en todas las indicadoras.

En LM el patrón de síntomas generado por cada aislado permitió una clara diferenciación entre ellos en cuanto a agresividad. Algunos solo manifestaron aclaramiento de nervadura, mientras otros exhibieron: fuerte enanismo, acentuada presencia de hojas en forma de “cuchara” y nervaduras corchosas, además hubo distintos grados de SP al finalizar la prueba. Lee y Bransky (1989) afirmaron que una reacción severa en lima mexicana no indica necesariamente que el aislado sea capaz de inducir síntomas severos tales como: SY, SP o DI en otras indicadoras. Sin embargo, en este estudio hubo buena correlación entre lo observado como aislado severo en lima y los aislados que resultaron severos al final de la prueba considerando la reacción en todas las indicadoras. En NA se observó diferentes reacciones en un corto periodo de indexaje. El 87% de los aislados produjo SY moderado o severo, síntoma principal en esta indicadora y generalmente asociado a aislados severos de CTV (Rocha-Peña et al., 1995). También se observó reacción de SY en pomelo, aunque, según Garsney et al. (2005) los síntomas foliares en pomelo Duncan son considerados como SY sí el aislado también genera SY en NA y no produce SP. En este estudio, la mayoría de los aislados que dieron SY en pomelo también manifestaron SY en NA y SP en pomelo, por lo que los síntomas foliares en pomelo estarían relacionados al SP. Por otra parte, el conjunto de síntomas observados en ND/NA (clorosis, enanismo), comúnmente asociados al anillamiento generado por la necrosis del floema en la zona del injerto (DL), se manifestó en la mitad de los aislados, pero en ellos no se observó tejido necrosado al finalizar el bioensayo. No obstante, el síntoma más importante para determinar la agresividad de

un aislado en un análisis biológico es la presencia y severidad de acanaladuras en la madera (SP) en pomelo y ND (Garsney et al. 2005) y en este caso el 85% de los aislados testeados generó algún grado de SP en ambas indicadoras, por lo que en el país hay presencia de aislados severos (Rocha-Peña et al. 1995, Broadbent et al. 1996) capaces de causar daño en variedades de naranjo dulce independientemente del portainjerto utilizado. Este resultado es muy importante en nuestras condiciones ya que el 90% de la citricultura está desarrollada sobre *P. trifoliata* para evitar el declinamiento por tristeza y se considera que por ello la enfermedad no afecta la producción, sin embargo, la presencia de SP en forma severa en los bioensayos indicaría que el potencial productivo podría estar limitado por ciertos aislados del virus (Roistacher et al. 2010, Rocha-Peña et al. 1995). Además, es de considerar que el 35% de los aislados provocó fuertes reacciones de SY en NA y pomelo, acentuado enanismo y clorosis foliar en ND/NA, SP moderados a severos en pomelo y ND, restricciones de crecimiento y nervaduras corchosas en varias indicadoras. Este grupo estaría conformado por aislados de CTV muy severos (Roistacher 1988, Rocha-Peña et al. 1995), que circulan tanto en el norte como en el sur del país, independientemente de la especie cítrica cultivada, confirmando los resultados obtenidos en pruebas anteriores (Maeso y Bertalmío Com. Pers.). También es de destacar que muestras colectadas en 2012 tienen el mismo patrón de síntomas que las muestras tomadas hace más de 15 años, que han permanecido sin exposición a intercambio de variantes del virus por el vector. En cuanto a la clasificación en los grupos biológicos establecidos por Garnsey et al. (2005), hubo patrones de síntomas compartidos por ciertos aislados y que se correlacionaron con determinados grupos biológicos, pero también hubo aislados que no clasificaron dentro de los grupos propuestos. Según Garnsey et al. (2005) los síntomas: DL, SY y SP en pomelo o ND son manifestaciones independientes de patogenicidad y no hay asociación entre ellos, por lo que algunos aislados inducen DI pero no SY, y a su vez éstos pueden ser expresiones independientes de SP. Por ej., el aislado AD1 mostró síntomas leves en casi todas las indicadoras, pero manifestó SP moderado en pomelo y severo en ND. Por otra parte, existió poca relación entre los síntomas generados en las indicadoras y el aspecto del árbol en campo. Sí bien CTV es endémico en nuestro país, es difícil

determinar visualmente árboles enfermos, salvo en plantaciones de 25-30 años donde es factible encontrar alguna sintomatología asociada al virus. Para este estudio, el 60% de las muestras fueron colectadas de árboles con aspecto normal en campo, sin embargo la mayoría de ellas indujeron SP moderado en PD y ND y reacción de SY en NA, es decir que árboles con aspecto saludable son portadores de variantes severas del virus; en general esto puede ocurrir porque en la planta hay una mezcla de aislados (Garnsey et al., 2005) que pueden segregar mediante la inoculación a las indicadoras (Lee y Brlansky, 1989). Esto puede haber sucedido con el aislado MIL que se obtuvo de una planta destacada en campo, de buen porte y producción, sin embargo dio reacciones severas en todas las indicadoras. En cambio, la mayoría de los aislados provenientes de árboles con ausencia de vigor mostraron SP moderado o severo en PD y/o ND y SY en NA, confirmando la presencia de cepas severas del virus.

Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas demuestran el predominio de cepas severas de CTV en el país. Si bien, esto puede tener importante repercusión a nivel productivo, el uso de *P. trifoliata* enmascara esta situación (no se ven síntomas en campo) y al ser una enfermedad endémica y con presencia del vector en el campo tampoco ha sido posible cuantificar pérdidas productivas. Además, la presencia de *Toxoptera citricida*, seguramente incide en la prevalencia y distribución de las variantes más severas del virus. Por esto, sería importante implementar un programa de protección cruzada que garantice que plantas saneadas no sean re-infestadas con aislados severos de CTV.

En cuanto a los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas a partir de los distintos aislados, para el gen p25 se observó la presencia de los genotipos VT, RB y NC, siendo mayoritario el genotipo NC (62% de las secuencias) reportado por Benítez-Galeano et al. (2015) y que fuera citado anteriormente por Harper (2013) como un posible nuevo genotipo de CTV al no poder clasificar al aislado HA16-5 de Hawaii en ninguno de los clados ya existentes (Figura 6). Iglesias et al. (2008) también reportaron que aislados argentinos formaban un clado distante de los demás genotipos de referencia para p25 y p27. Luego, Benítez-Galeano et al. (2015) al analizar secuencias uruguayas y argentinas, encontraron que varias de ellas

agruparon en el clado NC para el gen P25. Esto indicaría que filogenéticamente el virus a nivel regional es muy similar. Con respecto al gen p20 se encontraron los genotipos VT, NC y T3, con predominancia de este último. Para el gen p23, se observó mayor variabilidad, se obtuvieron los genotipos: VT, T68, RB y T3. En general, todos los genotipos mencionados están asociados a variantes severas del virus, excepto en el caso del genotipo NC para el cual no hay una descripción de síntomas. No se encontró ningún genotipo del tipo suave o intermedio según la clasificación de Sambade et al. (2003), aunque T36 fue reportado en el país (Benítez-Galeano, 2014) y T30 en Argentina (Iglesias et al., 2008). Por otro lado, es de destacar que se han encontrado secuencias del genotipo RB, con baja frecuencia, en aislados que fueron colectados hace más de 15 años y han permanecido en invernadero sin ser expuestos a intercambio genético, por lo tanto, este genotipo circula en el país desde hace mucho tiempo y se ha reportado que podría generar una infección sistémica en *P. trifoliata* (Harper et al. 2010, Dawson y Money 2000), nuestro principal portainjerto. En cuanto a la composición genética de cada aislado, solamente dos aislados (UY17 y UY18) tuvieron una composición homogénea, donde las secuencias mayoritarias agruparon con el genotipo VT; mientras que, la mayoría de los aislados mostraron alta variabilidad inter-génica, situación que también ha sido reportada en Argentina (Iglesias et al., 2008). Esta variabilidad, podría ser explicada por la presencia de infecciones mixtas en una planta (Iglesias et al. 2008, Hilf et al. 1999), fenómeno muy probable en nuestras condiciones porque, como ya fue mencionado, las plantas están expuestas a re-infecciones por la coexistencia de los distintos genotipos y el vector en el campo. Las infecciones mixtas también pueden dar lugar a genomas recombinantes (Rubio et al. 2001, Weng et al. 2007), evento frecuente en este virus (Harper et al., 2010) y que también otorga variabilidad genética y que ha determinado la evolución de los genotipos pre-establecidos. También es posible, que al existir genomas recombinantes, estemos amplificando para los distintos genes fragmentos diferentes de un mismo genoma y eso estaría explicando, en parte, la heterogeneidad genética en un mismo aislado. Esta situación también es bastante probable porque en los genotipos encontrados en el país: T3, T68, RB y NC, se han descrito eventos de recombinación (Harper,

2013), de hecho las muestras que se agruparon dentro del clado VT en los distintos árboles filogenéticos, siempre lo hacen con la secuencia NZ-M16 que es recombinante con el genotipo T3.

Por otra parte, la composición genotípica en muestras obtenidas hace más de 15 años y muestras que están actualmente en campo no han mostrado cambios sustanciales. En conclusión, se han encontrado poblaciones heterogéneas del virus en las distintas muestras, independientemente de la región citrícola y de la especie, lo que ratifica la presencia de infecciones mixtas en una planta. También se confirmó a nivel molecular la prevalencia de genotipos asociados a variantes severas del virus, coincidiendo con las reacciones observadas en el testaje biológico. Estos resultados refuerzan la necesidad de implementar un programa de protección cruzada, aunque también complejizan la obtención de aislados promisorios. La información genética del virus generada a nivel local, en este y otros trabajos (Benítez-Galeano et al. 2015, Benítez-Galeano 2014) es indispensable al plantearnos un programa de protección cruzada que tenga éxito, pues hoy se sabe que este mecanismo es genotipo específico (Foliminova, 2013). Otros países, con una situación similar a la nuestra, han utilizado aislados de campo para protección cruzada y con el tiempo han tenido problemas, perdiendo eficacia por haber trabajado con una mezcla de genotipos, como el caso del aislado GFMS12 utilizado en Sudáfrica (Scott et al., 2013), pues estos aislados pueden contener secuencias minoritarias severas que en algún momento se pueden expresar.

5. CONCLUSIONES

La caracterización biológica permitió diferenciar grupos de aislados que mostraron distinto grado de severidad, no obstante el 35% de los aislados estudiados presentaron síntomas de SY, ST, DI, VcK, asociados con reacciones de aislados muy severos.

La población viral a nivel genético es diversa, se han encontrado varios genotipos por muestra, afirmando la presencia de infecciones mixtas dentro de una planta, o la existencia de genomas recombinantes

Se han determinado molecularmente los genotipos: T3, T68, VT, RB y NC, sí bien actualmente no se vincula el genotipo a la producción de síntomas, según clasificaciones anteriores, éstos genotipos se corresponderían con aislados severos de referencia internacional, coincidiendo con las reacciones observadas en el testaje biológico.

Los estudios realizados indican que en nuestro país, independientemente de la localidad y la especie cítrica predominan aislados severos de CTV.

Los resultados obtenidos refuerzan la necesidad de implementar un programa de protección cruzada que complemente al programa de saneamiento de modo de llevar al campo plantas saneadas y pre-inmunizadas para CTV; aunque también complejizan la obtención de aislados promisorios.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Albiach-Martí M, Grosser J, Gowda S, Mawassi M, Satyanarayana T, Garnsey M, Dawson W. 2004. Citrus tristeza virus replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding*, 14(2): 117-128.
- Albiach-Martí M, Mawassi M, Gowda S, Satyanarayana T, Hilf M, Shanker S, Almira E, Vives M, Lopez C, Guerri J, Flores R, Moreno P, Garnsey S, Dawson W. 2000a. Sequences of Citrus tristeza virus separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, 74:6856-6865.
- Albiach-Martí M, Guerri J, Cambra M, Garnsey S, Moreno P. 2000b. Differentiation of citrus tristeza virus isolates by serological analysis of p25 coat protein peptide maps. *Journal Virology Methods*, 88: 25-34.
- Albiach-Martí M, Guerri J, Hermoso de Mendoza A, Laigret F, Ballester-Olmos J, Moreno P. 2000c. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology*, 90:134-138.
- Ayllón M, Rubio L, Sentandreu V, Moya A, Guerri J, Moreno P. 2006. Variations in two gene sequences of Citrus tristeza virus after host passage. *Virus Genes*, 32:119-128.
- Ayllón M, Lopez C, Navas-Castillo J, Garnsey S, 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. *Archives of Virology*, 146:27-40.
- Ayllón M, Rubio L, Moya A, Guerri J, Moreno, P. 1999. The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, 25:32-9.
- Balaraman K, Ramakrishnan K. 1980. Strain variation and cross protection in citrus tristeza virus on acid lime. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (8th, 1979, Mildura). Proceedings. Riverside. IOCV. pp:1-27.
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291-316.

- Bar-Joseph M, Garnsey S, Gonsalves D, Moscovitz M, Purcifull D, Clark M, Loebenstein G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology*, 69: 190-194.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G, Oren Y. 1974. Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (6th, 1972, Mbabane). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 83-85.
- Bar-Joseph M, Loebenstein G. 1973. Effects of strain, source plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology*, 63:716-720.
- Barzegar A, Rahimian H, Sohi H. 2009. Comparison of the minor coat protein gene sequences of aphid-transmissible and non-transmissible isolates of Citrus tristeza virus. *Journal of General Plant Pathology*, 76(2):143-151.
- Benítez-Galeano M, Rubio L, Bertalmío A, Maeso D, Rivas F, Colina R. 2015. Phylogenetic Studies of the Three RNA Silencing Suppressor Genes of South American CTV Isolates Reveal the Circulation of a Novel Genetic Lineage. *Viruses*, (7): 4152-4168.
- Benítez-Galeano M. 2014. Caracterización molecular y filodinámica del virus de la tristeza de los cítricos. Tesis de maestría. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Ciencias. 110p.
- Bentancour C, Scatoni I, Morelli E. 2009. Insectos del Uruguay. Montevideo. Facultad de Agronomía-Facultad de Ciencias, 657p.
- 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 K, Tarafdar A, Sharma S. 2012. Complete genome sequence of mandarin decline Citrus tristeza virus of the northeastern Himalaya hill region of India: comparative analyses determine recombinant. *Archives of Virology*, 157: 579-583.

- Bitters W. 1972. Reaction of some new citrus hybrids and citrus introductions as rootstocks to inoculations with tristeza virus in California. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (5th, 1969, Japón). Proceedings. Gainesville, Universidad of Florida Press. IOCV. pp: 14-16.
- Brlansky R, Damsteegt V, Howd D, Roy A. 2003. Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease*, 87: 397- 401.
- Broadbent P, Brlansky R, Indsto J. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease*, 80: 329-333.
- Broadbent P, Bevington KB, Coote BG. 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain cross protection. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (11th, 1989, Orlando). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 64-70.
- Brunt A, Crabtree K, Dallwitz M, Gibbs A, Watson L. 1996. *Viruses of Plants*. Wallingford, United Kingdom. CAB International. 1996pp.
- Calavan E, Harjung M, Blue R, Roistacher C, Gumpf D, Moore P. 1980. Natural spread of seedling yellows and sweet orange and grapefruit stem pitting tristeza viruses at the University of California, Riverside. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (8th, 1979, Mildura). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 69-75.
- Calavan E, Mather S, Mceachern E. 1978. Registration, certification and indexing of citrus trees. *The Citrus Industry*. Editor: University of California, Division of Agriculture Sciences, 4: 185-222.
- Cambra, M. y Ambrós, S. 2011. Bases para el control de las enfermedades causadas por el virus de la tristeza de los cítricos. *Vida Rural, España*, 335: 30-35.
- Cambra M, Gorris M. 2003. La tristeza de los cítricos en la cuenca del Mediterráneo. *Phytoma*, 153: 42-48.
- Cambra M, Moreno P. 2000. Tristeza. En: *Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología*, 2: 77-81.

- Cambra M, Gorris M, Marroquin C, Román M, Olmos A, Martínez M, Hermoso de Mendoza A, López A, Navarro, L. 2000a. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85-95.
- Cambra M, Gorris M, Román M, Terrada E, Garnsey S, Camarasa E, Olmos A, Colomer, M. 2000b. Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using monoclonal and recombinant antibodies. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (14th, 2000, San Pablo). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 34-41.
- Cambra M, Camarasa E, Gorris M, Garnsey S, Gumpf D, Tsai M. 1993. Epitope diversity of isolates of citrus tristeza virus (CTV) in Spain. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (12th, 1992, New Delhi). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 33-38.
- Cambra M, Garnsey S, Permar T, Gorris M, Henderson C, Gumpf D, Vela C. 1990. Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 1034
- Cambra M. 1983. Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: interés y aplicaciones. *Levante Agrícola*, 245: 11-17.
- Cambra M, Moreno P, Navarro L. 1979. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-Sandwich. *Anuales INIA, Serie Protección Vegetal* 12: 115-125.
- Cevick B, PappuS, Pappu H, Benschel D, Irey M, Lee R, Niblett C. 1996. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (13th, 1995, Fouzhan). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 17-23.
- Costa A, Nunes W, Corazza M, Zanutto C, Müller, G. 2010. Biological and molecular characterization of isolates of Citrus tristeza virus with potential for use in preimmunization programs. *Summa Phytopathologica*, 36: 81–82.
- Costa S, Müller G. 1980. Tristeza control by cross protection: a U.S .Brazil cooperative success. *Plant Disease*, 64:538-541.
- Costa S, Grant J. 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *Aphis citricidus*. *Phytopathology*, 41:105-113.

- Da Graça J, Van Vuuren S. 2010. Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection. En: Citrus tristeza virus Complex and Tristeza Diseases. American Phytopathological Society, 247-260.
- Davies F, Albrigo L. 1994. Citrus. Wallingford, United Kingdom. CAB International, 250pp.
- 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 Disease, 87(3): 314.
- Dawson T, Money P. 2000. Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of Citrus tristeza virus in New Zealand. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (14th, 2000, San Pablo). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 69-76.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. Producción [en línea] En: Anuario estadístico agropecuario 2014. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado en julio 2015. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/portal/diea/Encuesta_citrícola_2014, N°325.
- Dodds J, Lee J. 1991. An evaluation of types of citrus tristeza virus in selected sweet orange groves in Southern California. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (11th, 1989, Orlando). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 103-112.
- 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 (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) 2012. Producción [En línea]. En: Libro Anual Estadístico. Consultado en agosto 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/statistics/es/>.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 1978. Informe: mejoramiento y control de la sanidad citrícola. 51pp.
- Fawcett H, Wallace J. 1946. Evidence of the virus nature of citrus quick decline. California Citrograph, 32: 50, 88-89.

- Febres V, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath K, Lee R, Niblett C. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology*, 86:1331-1335.
- Folimonova S. 2013. Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology*, 4(75):1-9.
- Folimonova S, Robertson C, Shilts T, Folimonov A, Hilf M, Garnsey S, Dawson W. 2010. Infection with strains of Citrus Tristeza Virus does not exclude superinfection by other strains of the virus. *Journal of Virology*, 84:1314-1325.
- Francis M, Peyrou M, Perea B, Borde J, Fosali Y. 1997. Caracterización de aislamientos del virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) que causan pérdidas en pomelo injertado sobre Trifolia en Uruguay. En: Congreso Latinoamericano de Fitopatología (IX, 1997, Montevideo, Uruguay).
- Fraser, L. 1952. Seedling yellows, and unreported virus disease of citrus. *The agricultural gazette of New South Wales*, 63: 125-131.
- Garnsey S, Civerolo E, Gumpf D, Paul C, Hilf M, Lee R, Brlansky R, Yokomi R, Hartung J. 2005. Biological characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (16th, 2005, Monterrey). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 75-93.
- Garnsey S, Gottwald T, Yokomi R. 1998. Control strategies for citrus tristeza virus. En: Plant virus disease control: American Phytopathological Society, pp: 639-658.
- Garnsey S, Permar T, Cambra M, Henderson C. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (12th, 1992, New Delhi). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 39-50.
- Garnsey S, Lee R. 1988. Tristeza. En: Compendium of citrus diseases. Editores: Whiteside J, Garnsey S, Timmer L. The American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA. pp. 48-50

- Garnsey S, Barret H, Hutchkinson D. 1987a. Identification of Citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potencial applications. *Phytophylactica*, 19: 187-191.
- Garnsey S, Gumpf D, Roistacher C, Civerolo E, Lee R, Yokomi R, Bar-Joseph M. 1987b. Toward standarized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica*, 19:151-157.
- Garnsey S, Müller G. 1986. Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus (CTV). En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (10th, 1986, Valencia). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 46-54.
- Garnsey S, Christie R, Derrick K, Bar-Joseph M. 1980. Detection of citrus tristeza virus. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (8th, 1979, Mildura). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 9-17.
- Giacometti D, Costa A. 1958. Nursery behavior of infected West Indian lime scions on tristeza tolerant rootstocks. *Plant Disease*, 42: 928-31.
- Gillings M, Broadbent P, Indsto J, Lee R. 1993. Characterization of isolates of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virology. Methods*, 44: 305-317.
- Gonsalves, D. y Garnsey, S. 1989. Cross-protection techniques for control of plant virus diseases in the tropics. *Plant Disease*, 73:592-597.
- Gottwald T, Polek M, Riley K. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (15th, 2001, Cyprus). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 83-94.
- Gottwald T, Cambra M, Moreno P, Camarasa E, Piquer J. 1996a. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in Eastern Spain. *Phytopathology*, 86: 45-55.
- Gottwald T, Garnsey S, Cambra M, Moreno P, Irey M, Borbón J. 1996b. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza. En: Conference of International

- Organization of Citrus Virologists (13th, 1995, Fouzhan). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 120-129.
- Gowda S, Satyanarayana T, Davis C, Navas-Castillo J, Albiath-Martí M, Mawassi M, Kalkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson W. 2000. The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*, 274: 246-254.
- Grant T, Higgins R. 1957. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains in citrus. *Phytopathology*, 47: 272-276
- Hall R. 1994. Treating tristeza in the San Joaquin Valley. Is the cure worse than the disease? *California Grower*, 30-32.
- Harper S. 2013. Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, 4(93):1-18.
- Harper S, Dawson T, Pearson N. 2010. Isolates of Citrus tristeza virus that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, 155: 471-480.
- Harper S, Dawson T, Pearson M. 2009. Complete genome sequences of two distinct and diverse Citrus tristeza virus isolates from New Zealand. *Archives of Virology*, 154: 1505–1510.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos J, Pina J. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (9th, 1983, Argentina). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 23-27.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos J, Pina J., Serra J, Fuertes C.1988. Differences in transmission efficiency of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin or lemon trees as donor or receptor hosts plants. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (10th, 1986, Valencia). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 62-64.
- Hilf M, Mavrodieva V, Garnsey S. 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 M, Garnsey S. 2000. Characterization and classification of citrus tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (14th, 2000, San Pablo). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 18-27.
- Hilf M, Karasev A, Albiach-Marti M, Dawson W, Garnsey S. 1999. Two paths of sequence divergence in the Citrus tristeza virus complex. *Phytopathology*, 89:336-342.
- Hughes W, Lister C. 1949. Lime disease in the Gold Coast. *Nature*, 164: 880.
- Iglesias N, Gago-Zachert S, Robledo G, Costa N, Plata MI, Vera O, Grau O, Semorile L. 2008. Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. *Virus Genes*, 36:199–207.
- Karasev A, Boyko V, Gowda S, Nikolaeva O, Hilf M, Koonin E, Niblett C, Cline K, Gumpf D, Lee R, Garnsey S, Lewandowski D, Dawson W. 1995. Complete Sequence of the Citrus Tristeza Virus RNA Genome. *Virology*, 208:511-520.
- Kitajima E, Silva D, Olivera A, Müller G, Costa S. 1964. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature*, 201: 1011-12.
- 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 N° 106, 65pp.
- Koizumi M. 1991. Citrus tristeza virus field isolates from declined or dwarfed citrus trees in Japan. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (11th, 1989, Orlando). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 25-30.
- Lee R, Brlansky R. 1989. Variation in the severity of citrus tristeza virus isolates from groves with quick decline. *Proceeding Florida State Horticultural Society*, 102:1-3.
- Lee R, Brlansky R, Garnsey S, Yokomi R 1987. Traits of citrus tristeza virus important for mild strain cross protection of citrus: the Florida approach. *Phytophyllactica*, 19: 215-218.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li W, Falk B, Dawson W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 101: 15742–15747.

- Manjunath K, Lee R, Niblett C. 2000. Recent advances in the molecular biology of citrus tristeza closterovirus. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (14th, 2000, San Pablo). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 1-11.
- Mawassi M, Mietkiewska E, Gofman R, Yang G, Bar-Joseph JM. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of Citrus tristeza virus. Journal General of Virology, 77:2359-2364.
- McClellan A. 1974. Abnormal bud union between some sweet oranges and rough lemon rootstock: Evidence of cause by a transmissible pathogen. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (6th, 1972, Swaziland). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 203-210.
- Melzer M, Borth W, Sether D, Ferreira S, Gonsalves D, Hu J. 2010. Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian Citrus tristeza virus. Virus Genes, 40:111-118.
- Mendoza A, Salazar C, Alvarado O, Cruz M, Barrera Saldaña H. 2005. Caracterización molecular de razas severas y débiles del virus de la tristeza de los cítricos. Ciencia, Universidad Autónoma de Nuevo León, 8 (2): 250-258.
- Meneghini, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade de doença "tristeza" dos citrus. Ó Biologica, 12: 115-118.
- Mestre P, Asins M, Pina J, Navarro L. 1997. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L) Raf. to citrus tristeza virus. Theoretical and Applied Genetics, 95: 691-95
- Moreira S. 1942. Observações sobre a "tristeza" dos citrus ou "podridão das radículas". O. Biologico, 8: 269-72.
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí M, Guerri J, Peña L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology, 9:251-268.
- Moreno P, Guerri J, Rubio L, Vives C, Sambade A, Martín S, Moya P, Ambrós S. 2007. Variabilidad del agente causal de la tristeza de los cítricos: avances y perspectivas. Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatología, 88: 104-106.

- Moreno P, Guerri J, Ballester-Olmos J, Albiach, R, Martínez M. 1993. Separation and interference of strains from a citrus tristeza virus isolate evidenced by biological activity and double-stranded RNA (dsRNA) analysis. *Plant Pathology*, 42: 35–41.
- Muharam A, Whittle M. 1991. Stem-pitting Strains of Citrus Tristeza Virus in Indonesia. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists, (11th, 1989, Orlando). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 150-155.
- Muller, I.y Campiglia 1981. Investigaciones Agronómicas año2 n°1.
- Müller G, Costa A. 1987. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica*, 19:197-198.
- Müller G, Costa A, Kitajima E, Camargo I.1974. Additional evidence that tristeza multiplies in *Passiflora* spp. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (6th, 1972, Swaziland). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 75-78.
- Müller G, Costa A. 1968. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (4th, 1966, Catania). Proceedings. Gainesville, University of Florida Press. IOCV. pp: 71-83.
- Narváez G, Skander B, Ayllon M, Rubio L, Guerri J, Moreno P. 2000. A new procedure to differentiate Citrus tristeza virus isolates by hybridization with digoxigenin labelled cDNA probes. *Journal of Virological Methods*, 85:83-92.
- 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: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (15th, 2002, Cyprus). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 306-316.
- Navarro L. 1993. Citrus sanitation, quarantine and certification programs. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (12th, 1992, New Delhi). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 383-391.

- Navarro L, Roistacher C, Murashige T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. Journal American Society Horticultural Sciences, 100: 471-479.
- Niblett C, Genc H, Cevik B, Halbert S, Brown L, Nolasco G, Bonacalza B, Manjunath K, Febres V, Pappu H, Lee R. 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of citrus tristeza disease. Virus Research, 71:97-106.
- 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. Journal of Virological Methods, 45:201-218.
- Oberholzer P, Mathews I, Stiemie S. 1949. The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on so-called "stem pitting". Union South Africa Science, Bulletin 297: 18 pp.
- Olmos A, Cambra M, Esteban O, Gorris M, Terrada E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. Nucleic Acids Research, 27:1564-1565.
- Palacios, J. 1978. Citricultura moderna. Buenos Aires. Hemisferio Sur. 409p.
- Papic T, Santos C, Nolasco G. 2005. First report of Citrus tristeza virus (CTV) in State Union of Serbia and Montenegro. Plant Disease, 89: 434.
- Pappu H, Karasev A, Anderson E, Pappu S, Hilf M, Febres V, Eckloff M, McCaffery M, Boyko V, Gowda S, Dolja V, Koonin E, Gumpf D, Cline K, Garnsey S, Dawson W, Lee R, Niblett C. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. Virology, 199: 35-46.
- Pappu H, Manjunath K, Lee R, Niblett C. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 90:3641-3644.
- Permar T, Garnsey S, Gumpf D, Lee R. 1990. A monoclonal antibody which discriminates strains of Citrus tristeza virus. Phytopathology, 80:224-228.
- Rocha-Peña M, Lee R, Lastra R, Niblett C, Ochoa-Corona F, Garnsey S, Yokomi R. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to

- citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*, 79:437-443.
- Roistacher C, Da Graça J, Müller G. 2010. Cross Protection Against Citrus Tristeza Virus a Review. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (17th, 2007, Adana). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 1-27.
- Roistacher C. 1995. An historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. FAO, Cairo, Egypt, 89pp.
- Roistacher C. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. pp 17-25.
- Roistacher C, Moreno P. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of Citrus tristeza virus. En: Conference of the International Organization of Citrus Virologists (11th, 1989, Orlando). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 7-19.
- Roistacher C. 1988. Observations on the decline of sweet orange trees in coastal Peru caused by stem-pitting tristeza. *Plant protection bulletin, India*, 36: 19-26.
- Roistacher C, Bar-Joseph M. 1987a. Transmission of Citrus tristeza virus (CTV) by *Aphis gossypii* and by graft inoculation to and from *Passiflora* spp. *Phytophylactica* 19, 179-182.
- Roistacher C, Bar-Joseph M. 1987b. Aphid transmission of tristeza virus: a review. *Phytophylactica*, 19: 163-167.
- Roistacher C, Gumpf D. 1986. An historical perspective on seedlings yellows virus. *California Citrograph*: 189-192.
- Roistacher C, Bar-Joseph M. 1984. Transmission of tristeza and seedlings yellows tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. En: Conference of International Organization of Citrus Virologists (9th, 1983, Argentina). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 9-18.
- Roistacher C, Blue R, Nauer L, Calavan, E. C. 1974. Suppression of tristeza virus symptoms in Mexican Lime seedlings grown at warm temperatures. *Plant Disease*, 58: 757-760.
- 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, Manjunath K, Brlansky R. 2005. Assessment of sequence diversity in the 5'-terminal region of Citrus tristeza virus from India. *Virus Research*, 113:132-142.
- Rubio L, Ayllon M, Kong P, Fernandez A, Polek M, Guerri J, Moreno P, Falk B. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75:8054-8062.
- Rubio L, Guerri J, Moreno P. 2000. Characterization of Citrus Tristeza Virus Isolates by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of DNAC Complementary to Their RNA Population. En: Conference of International Organization of CitrusVirologists (14th, 2000, San Pablo). Proceedings. Riverside. IOCV. pp: 12-17.
- 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.
- 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. Valencia, España. Universidad Politécnica de Valencia. 245pp.
- 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.
- Ruiz-Ruiz S, Moreno P, Guerri J, Ambrós S. 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Archives of Virology*, 151: 387-398.
- 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. *Archives of Virology*, 148:2325-2340.

- Satyanayanana T, Bar-Joseph M, Mawassi M, Albiach-Martí M, Ayllón M, Gowda S, Hilf M, Moreno P, Garnsey S, Dawson W. 2001. Amplification of Citrus tristeza virus from a cDNA clone and infection of citrus trees. *Virology*, 280: 87–96.
- Satyanayanana T, Gowda S, Boyko V, Albiach-Martí M, Mawassi M, Navas-Castillo J, Karasev A, Dolja V, Hilf M, Lewandowsky J, Moreno P, Bar-Joseph M, Garnsey S, Dawson W. 1999. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 96: 7433–7438.
- Schneider H. 1959. The anatomy of tristeza-virus-infected citrus. En: *Citrus Virus Diseases* (Wallace JM ed), pp. 73-84. University of California Division of Agricultural Sciences.
- Schneider, H. 1954. Anatomy of bark of bud union, trunk and roots of quick decline affected sweet orange trees on sour orange rootstocks. *Hilgardia*, 22: 567-581.
- Scott K, Hlela Q, Zablocki O, Read D, van Vuuren S, Pietersen G. 2013. Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting citrus tristeza virus strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Archives of Virology*, 158: 27-37
- Suastika G, Natsuaki T, Terui H, Kano T, Ieki H & Okuda S. 2001. Nucleotide sequence of citrus tristeza virus seedling yellows isolate. *Journal of General Plant Pathology*, 67:73-77.
- Tatineni S, Robertson C, Garnsey S, Bar-Joseph M, Gowda S, Dawson W. 2008. Three genes of Citrus tristeza virus are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology*, 376:297-307.
- Timmer L, Garnsey S, Graham J. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. The American Phytopathological Society. 2ed. Florida, USA. 92 pp.
- Van Vuuren S, Martix J, Combrink N. 2009. Citrus tristeza virus cross-proteccion of Palmer navel orange in the Eastern Cape province of South Africa. *South Africa Journal Plant and Soil*, 26(2): 98-101.

- Van Vuuren S, Da Graça J. 2000. Reductions in “Marsh” grapefruit tree size infected with citrus tristeza virus populations. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75: 542-545.
- Vela C, Cambra M, Cortes E, Moreno P, Miguët J, Perez de San Roman C, Sanz A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for Citrus tristeza virus and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67:91-96.
- Vives M, Rubio L, Sambade A, Mirkov L, Moreno P, Guerri J. 2005. Evidence of multiple recombination events between two RNA sequences variants within a Citrus tristeza virus isolate. *Virology*, 331:232-237.
- Vives M, Rubio L, López C, Navas-Castillo J, Albiach-Marti M, Dawson W, 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.
- Wallace J. 1978. Virus and viruslike diseases. Editores: Reuther E, Calavan E, Carman G. *The Citrus Industry*, University of California, Division of Agriculture Sciences, USA, 4: 67-184.
- Wallace J, Drake R. 1951. Newly discovered symptoms of quick decline and related diseases. *Citrus leaves*, 31: 8-30.
- Weng Z, Barthelson R, Gowda S, Hilf M, Dawson W, Galbraith D, 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.
- Yokomi R, Lastra R, Stoetzel M, Lee R, Garnsey S, Gottwald T, Rocha-Peña M, Niblett C. 1994. Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and transmission of citrus tristeza virus. *Journal of Economic Entomology*, 87: 1078-1085.
- Yokomi R, Garnsey S. 1987. Transmission of citrus tristeza virus by *A. gossypii* and *A. citricola* in Florida. *Phytophylactica*, 19:169–72.

7. ANEXO

Caracterización biológica y molecular de aislados de campo de CTV¹

L. Rubio¹

¹Programa Nacional de Producción Citrícola. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. INIA Salto Grande. Uruguay. lrubio@inia.org.uy

Resumen

Citrus tristeza virus (CTV) es el agente causal de una de las enfermedades virales más importantes de los cítricos. En nuestro país, a pesar del uso de portainjertos resistentes, se han reportado síntomas que afectan el potencial productivo de las plantas. Aunque, este patógeno es eliminado durante la etapa de saneamiento, la presencia endémica del virus y del vector, determinan un alto riesgo de re-infección en campo con aislados severos. Una solución a este problema es la inoculación de plantas saneadas con aislados “suaves” de CTV, medida que se conoce con el nombre de “protección cruzada”. Para implementar este mecanismo es necesario caracterizar los aislados locales. El objetivo de este trabajo fue determinar la severidad de 20 aislados locales de CTV mediante bioensayos y métodos moleculares. Los bioensayos se realizaron en un invernadero con condiciones controladas, donde cada aislado fue inoculado en 5 especies indicadoras: lima mexicana, naranjo dulce, naranjo agrio, pomelo Duncan y naranjo dulce/naranjo agrio. Se evaluó la presencia y severidad de los síntomas generados por cada aislado. La caracterización molecular se realizó mediante la técnica de amplificación por RT-PCR, utilizando el método “primer específico” para los genes P25, P20 y P23.

¹Se publicará en Agrocienza Uruguay.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas con cepas de referencia internacional y se construyeron árboles filogenéticos. Los resultados obtenidos en el testaje biológico y la caracterización molecular demuestran el predominio de cepas severas de CTV, tanto en el norte como en el sur del país.

Palabras claves: CTV, aislados, protección cruzada, severidad.

Biological and molecular characterization of field isolates of CTV

Summary

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of one of the most important viral diseases of citrus. In our country, despite the use of resistant rootstocks, symptoms that affect the productive potential of plants have been reported. Although this pathogen is effectively eliminated by sanitation, endemic presence of this virus and its vector represents a high re-infection risk with severe isolates. "Cross-protection", the inoculation of virus-free plants with "mild" CTV isolates, could contribute to solve this problem. First, it is necessary to know the composition of local CTV isolates to implement it. The aim of this study was to determine the severity of 20 local CTV isolates using bioassays and molecular methods. Bioassays were conducted in a greenhouse with controlled conditions, where each isolate was inoculated on five indicator species: Mexican lime, sweet orange, sour orange, grapefruit Duncan and sweet / sour orange orange. Presence and severity of symptoms generated by each isolated were evaluated. Molecular characterization was carried out by RT-PCR amplification, using P25, P20 and P23 genes specific primers. The nucleotide sequences obtained were aligned with international reference

strains and phylogenetic trees were constructed. Bioassays and molecular characterization revealed the prevalence of severe CTV strains in the north and south of country.

Keywords: CTV, isolates, cross protection, severity.

Introducción

Los cítricos son el rubro de mayor importancia dentro del área hortifrutícola del país, con una producción de 300 mil toneladas al año, de las cuales la mitad se exporta (DIEA, 2014), siendo proveedor en "contra-estación" fundamentalmente para la Unión Europea. Como rubro exportador, la cadena citrícola, es demandante de tecnologías y medidas de manejo que incrementen su producción en términos de volumen y calidad, siendo los problemas sanitarios una de sus principales limitantes productivas. La Tristeza es una de las enfermedades virales más importante de los cítricos, ha causado la muerte de millones de plantas en todo el mundo (Rostaicher et al., 2010; Moreno et al., 2008; Bar-Joseph et al., 1989). En nuestro país Koch de Brotos y Boasso reportaron el virus en 1955, actualmente es una enfermedad endémica y está presente su vector más eficiente *Toxoptera citricida* (Bentancour et al., 2009; Hermoso de Mendoza et al., 1984). Sin embargo, el síntoma típico de declinamiento está ausente, ya que el 90% de la citricultura del país utiliza *P. trifoliata* o sus híbridos (Citrange, Carrizo y Troyer) como portainjerto y se considera por ello que la enfermedad no afecta la producción. No obstante, se han observado acanaladuras en el tronco y ramas de pomelos y naranjos dulces, injertados sobre *P. trifoliata* y fruta de calibre pequeño (Muller y Campiglia, 1981; Francis et al., 1997), síntomas que corresponderían a la presencia de aislados severos de CTV, los que

podrían estar limitando el potencial productivo de las plantas cítricas. De hecho, en regiones con una situación similar a la de Uruguay (portainjertos tolerantes y presencia de *T. citricida*) se ha registrado la predominancia de aislados muy agresivos de CTV (Da Graça y Van Vuuren, 2010; Roistacher et al., 2010). Por otra parte, la constatación en Nueva Zelanda, de cepas de CTV que superan la resistencia de *P. trifoliata* (Harper et al., 2010; Dawson y Money et al., 2000), constituye una amenaza para nuestra citricultura. En Uruguay desde el año 2010 se desarrolla el Programa Nacional de Saneamiento de Citrus, la tristeza, como enfermedad de propagación vegetativa, es eliminada en esta instancia. Sin embargo, la coexistencia del virus y el vector en el campo, no impiden que una planta saneada sea re-infectada en poco tiempo. El saneamiento por sí solo no contribuye al manejo de la enfermedad en nuestras condiciones, por lo tanto, desarrollar un programa de protección cruzada (Costa y Müller, 1980; Müller y Costa, 1987) sería una alternativa de manejo interesante para disminuir los efectos del virus en la producción nacional. El primer paso para implementar este mecanismo es conocer las características de los aislados locales. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue conocer las características a nivel biológico y molecular de aislados del virus que circulan en el país.

Materiales y métodos

1. Caracterización biológica

a. Aislamientos de CTV

En el estudio se incluyeron aislamientos de campo de muestras colectados en los años 1996-98, que fueron mantenidas en invernadero a prueba de insectos sobre

limón rugoso y muestras de campo colectadas en el año 2012. Los relevamientos se realizaron en las principales áreas citrícolas del país. En cada sitio de muestreo la búsqueda estuvo direccionada a localizar árboles con presencia de "stem pitting" (acanaladuras en tronco y/o ramas), pobre desarrollo y fruta pequeña, como posibles indicios de portar una cepa severa del virus. Simultáneamente se seleccionaron árboles cercanos a éstos, que presentaban aspecto saludable, buen vigor y ausencia de acanaladuras, como posibles hospederos de cepas suaves de CTV. Para el estudio se seleccionaron 20 aislamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos utilizados en el estudio.

Localidad	Variiedad	Códigos	Nºmuestra PCR	Año Colecta	Aspecto del árbol en campo
SUR (San José)	Washington Navel	AD1	16	1998	Sin vigor ("Chico")
		AD3	17	1998	Normal ("Sano")
		AD6	18	1998	Normal, SP moderado
		AD8	19	1998	Normal ("Sano")
		AD10	4	1998	Normal ("Sano")
	Satsuma	AD11	20	1998	Fruta pequeña, SP severo
		AD12	21	1998	Acentuada ausencia de vigor.
SUR (Canelones)	Limón	MO15	2	1998	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Valencia	AZ1M1	8	1998	Sin vigor ("Chico"), ramas secas
NORTE (Salto)	Valencia	CAP1	12	2012	Normal ("Sano")
		CAP2	5	2012	Normal ("Sano")
		CAP3	13	2012	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Lane Late/Trifolio	SASA 1	9	1997	Normal ("Sano")
		SAG 4	14	1997	Normal ("Sano")
	Ortanique/Trifolio	SAG 6	15	1997	Normal ("Sano")
		SACH 1	11	1997	Sin vigor ("Chico") sin SP
	Lane Late/Trifolio	SACH 2	7	1997	Sin vigor ("Chico"), sin SP
NORTE (Salto)	Pomelo Star Ruby	MILCH 1	3	1997	Sin vigor ("Chico"), SP suave
	Satsuma Owari	MIL1	22	2012	Buen porte y producción de fruta
NORTE (Salto)	Pomelo Marsh	CG 1	6	1996	Normal ("Sano")
NORTE (Paysandú)	Navel	FOR 1*	10	2006	
SUR (San José)	Limón	TRU 7*		1993	

*Testigos positivos

b. *Bioensayos*

La caracterización biológica se realizó según la metodología propuesta por Garney et al. (1987), utilizando un invernadero con malla anti-áfidos y con un rango de temperatura controlada entre 18 y 26°C. La actividad biológica de cada aislado fue evaluada utilizando cinco especies indicadoras: lima mexicana (LM), naranjo agrio (NA), pomelo cv. Duncan (PD), naranjo dulce cv. Madame Vinous (ND), y la combinación naranjo dulce/naranjo agrio (ND/NA), cada una de ellas induce un conjunto determinado de síntomas (Cuadro 2). Cada aislado fue inoculado mediante el injerto de dos trozos de corteza en tres plantines de cada especie indicadora. Se utilizaron cuatro plantas como controles negativos y cuatro como controles positivos por indicadora. La infección por CTV fue confirmada mediante la prueba DAS-ELISA, utilizando el kit Magic-DAS ELISA proveniente de Plant Print Diagnostics S.L. (Valencia, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dos meses luego de la inoculación, las plantas fueron podadas, conducidas a una sola rama y se mantuvieron en condiciones óptimas para el desarrollo de síntomas. La evaluación de síntomas se realizó en cada brotación ocurrida post-inoculación. Los síntomas foliares evaluados fueron: aclaramiento de nervaduras, hoja en forma de cuchara, presencia de nervaduras corchosas y clorosis. La presencia de “stem pitting” (SP) se evaluó al finalizar el test (10-12 meses post-inoculación), para ello se procedió al pelado de las ramas por encima de la zona de inoculación. El “stunting”(ST) o enanismo, fue evaluado visualmente y midiendo el crecimiento del plantín, tomando como punto inicial de crecimiento la zona de corte post-inoculación, y también se registró la presencia de epinastia y la reducción en el tamaño de las hojas de brotes

nuevos. La severidad de cada síntoma se valoró según la siguiente escala: 0= sin síntomas, 1= síntomas leves, 2= s. moderados, 3= síntomas severos. El período de evaluación de síntomas estuvo sujeto a la obtención de los síntomas esperado en cada indicadora, con máximo de un año.

Cuadro 2. Síntomas evaluados en cada indicadora*

Síntomas esperados	Indicadora				
	LM	PD	ND	NA	NA/ND
Aclaramiento de nervaduras =VC	x				
Hojas forma de cuchara = HC	x				
Nervaduras corchosas = VCk	x				
Enanismo =ST	x	x	x	x	x
Acanaladuras del tallo =SP	x	x	x		
Amarillamiento del plantín = SY		x		x	x
Clorosis = C			x		x
Declinamiento = DL					x

* LM: lima mexicana, PD: pomelo Duncan, ND: naranjo dulce, NA: naranjo agrio, NA/ND: naranjo dulce/agrio.

2. Caracterización molecular

a. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y amplificación por PCR.

El tejido vegetal fue homogeneizado con nitrógeno líquido y el RNA total fue extraído usando el kit de RNeasy Plant Mini (QIAGEN®, Hilden, Germany), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó utilizando 2 µg de ARN, 0,5µl de random primers (10µM) y agua estéril para completar el volumen final; la mezcla fue incubada por 5min a 95°C y por 4min en hielo. Luego se incorporó a cada tubo 3,75 µl de la mezcla compuesta por : 2µl de buffer RT (10X), 1µl de dNTP (10mM), 0,25µl de Inhibidor de RNAsas (Ribolock, Thermo Scientific) y 0,5 µl de M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/uL). La retrotranscripción se realizó según instrucciones del fabricante. Para la amplificación de las tres regiones

estudiadas la solución para un volumen final de 25 µl estuvo constituida por: 2µl de ADNc, 2,5µl de 10X Taq buffer con (NH₄)₂SO₄ (750 mM Tris-HCl (pH 8.8 at 25 °C), 1µl de cada primer (10uM), 2µl de MgCl₂ (25mM), 0,7µl de dNTP (10mM c/u), 18,4µl de agua y 0,4µl de Taq Polimerasa (5 U/uL) (Thermo Scientific Inc., Hanover, MD, USA). Los primers utilizados para amplificar los genes p20, p23 y p25 se detallan en el cuadro 3. Las condiciones de ciclado para los genes p20 y p25 fueron: una fase inicial de desnaturalización a 95°C por 4min; 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 72°C y una extensión final de 2min a 72°C. Para el gen p23, la temperatura de *annealing* fue de 54°C, con el resto del ciclado igual a lo mencionado para p20 y p25. El producto de la amplificación se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2%. Los fragmentos amplificados fueron purificados utilizando el kit “AxyPrep DNA Gel Extraction” (Axygen Inc., EEUU), según recomendaciones del fabricante.

Cuadro 3. Primers utilizados para la amplificación de los genes p20, p23 y p25 de CTV.

Primer	Secuencia (5'-3')	Tamaño de banda	Referencias
p25F	TGAATTATGGACGACGAAAC	677pb	Iglesias et al., 2008
p25R	TCAACGTGTGTTGAATTTCCC		
P20F	ACAATATGCGAGCTTACTTTA	561pb	Rubio et al., 2001
p20R	AACCTACACGCAAGATGGA		
PM50	ACTAACTTTAATTGGAACA	697pb	Sambade et al., 2003
PM51	AACTTATTCGTCCTTCTC		

b. Secuenciación, Alineamiento y Análisis filogenéticos

La secuenciación de los amplicones se realizó en ambos sentidos (5'-3' y 3'-5'), utilizando para cada gen los primers específicos utilizados para la amplificación. Las

secuencias fueron ensambladas y editadas con el programa SeqMan (Lasergene, DNASTAR). Los alineamientos se realizaron con el programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis 6.0 (MEGA 6.0) a través del método Clustal W. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de CTV consideradas de referencia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Los análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 6.0 utilizando el método de Neighbor Joining (NJ) con el modelo Kimura 2 Parámetros (K2P) y 1000seudoréplicas de apoyo estadístico.

Resultados y discusión

1. Caracterización biológica

En los bioensayos se observó el patrón de síntomas esperables en las distintas indicadoras (Figura 1), con variación en la presencia y en el grado de expresión de los mismos según el aislado (Cuadro 4). En LM, sí bien, todos los aislados produjeron síntomas, algunos solo manifestaron aclaramiento de nervadura, mientras otros evidenciaban fuerte enanismo, acentuada presencia de hojas en forma de “cuchara”, nervaduras corchosas y variado grado de acanaladuras (SP). El patrón de síntomas en LM permitió una clara diferenciación entre aislados en cuanto a agresividad, aunque Lee y Brlansky (1989) afirmaron que una reacción severa en LM no indicaría necesariamente que el aislado sea capaz de inducir SY, SP o DI (síntomas considerados severos) en otras indicadoras. En NA el síntoma de amarillamiento del plantín (SY) se produjo en el 87% de los aislados, siendo su nivel de severidad mayoritariamente moderado o severo, éste síntoma es asociado a aislados severos de CTV (Rocha-Peña et al., 1995). También se observó reacción de

SY en PD, aunque, según Garnsey et al. (2005) los síntomas foliares en PD son considerados como SY sí el aislado también genera SY en NA y no produce SP; en nuestro caso la mayoría de los aislados que dieron SY en PD también manifestaron SY en NA y SP en PD. Por otra parte, la mitad de los aislados generaron clorosis foliar y enanismo en ND/NA y la mayoría de ellos presentó leve o moderada clorosis en la nervadura central de la hoja, síntomas asociados al declinamiento (DL), aunque al finalizar el bioensayo no se observó tejido necrosado en la zona del injerto. Considerando que el síntoma más importante para determinar la agresividad de un aislado en un bioensayo es la presencia y severidad de acanaladuras en la madera (SP) en PD y ND (Garsney et al., 2005), el 85% de los aislados generó algún grado de SP en ambas indicadoras, por lo que en el país hay aislados severos de CTV (Rocha-Peña et al., 1995; Broadbent et al., 1996) capaces de causar daño en variedades de naranjo dulce independientemente del portainjerto utilizado (Roistacher et al., 2010).



Figura 1. Síntomas observados: a) aclaramiento de nervaduras, b) hojas en forma de cuchara, c) nervaduras corchosas en lima mexicana; d) amarillamiento del plantín (SY) en NA; e) acanaladuras (SP) en ND (izquierda) y en PD (derecha); f) vena principal clorótica en ND/NA, g) enanismo (derecha), plantas normales (izquierda) en NA.

Cuadro 4. Síntomas producidos* por los distintos aislamientos en cada indicadora, según escala de severidad **.

Localidad	Variedad	Aislamiento	Indicadora												
			Lima mexicana					N.dulce/N.Agrio				N.Agrio	Pomelo		N.dulce
			VC	HC	Vck	SP	ST	NCI	ST	C	DL	SY	SY	SP	SP
Salto	Valencia	CAP1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Salto	Valencia	CAP3	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Paysandú	Navel	SAG4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
Salto	Valencia	CAP2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	++	+	+	-
San José	Satsuma	AD12	++	+	-	++	-	-	-	+	-	-	+	+	+
San José	Navel	AD3	+	++	-	+++	-	+	+	-	+	+++	+	+	+
San José	Navel	AD11	+++	+	-	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+	+
Salto	Pomelo	MILCH	+	+	-	+++	-	+	-	+	-	-	-	++	+
San José	Navel	AD8	++	++	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++	+
San José	Navel	AD10	+	++	-	+++	-	+	++	+++	++	++	+	++	+
Salto	Pomelo	CG1	++	+	-	+++	-	+	++	+	++	-	-	++	+
Canelones	Limón	MO15	++	++	-	+++	+	-	-	-	-	-	+	+++	+
San José	Navel	AD6	++	++	-	+++	-	+	+	+	+	+	+	+	++
San José	Navel	AD1	+	+	-	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
Paysandú	Navel	SACH2	+	+	-	+++	-	+	+++	+++	+++	++	+++	+	++
Paysandú	Navel	SASA1	+	+	+	+++	++	++	+++	++	+++	++	++	++	++
Paysandú	Ortanique	SAG6	++	++	-	+++	-	+	+++	+++	+++	++	++	++	++
Paysandú	Navel	SACH1	+	+	-	+++	-	+	++	++	++	+++	+++	++	++
Paysandú	Valencia	AZ1	+	+	+	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	++
Salto	Satsuma	MIL	+	-	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++
		TR7	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+++	-	-	-
	Testigos	FOR 1	-	+	+	+++	++	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++
		Testigo neg.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: VC: aclaramiento de nervaduras (vein clearing), HC: hojas en forma de cuchara, Vck: nervaduras corchosas (vein corcking), ST: enanismo (stunting), SP: acanaladuras (stem pitting), NCI: nervadura clorótica, C: clorosis foliar, DL: declinamiento (clorosis y enanismo), SY: amarillamiento del plantín (seedlings yellows).

** Escala de severidad de síntomas: - ausencia, + síntomas leves, ++ moderados, +++ severos.

La expresión y severidad de los síntomas producidos permitió agrupar aislados que compartían ciertas reacciones (Cuadro 4). Dos aislados produjeron síntomas leves en LM y alguna otra indicadora, por lo que podrían considerarse como poco virulentos. Otro grupo (15% de los aislados) manifestó síntomas leves en LM y otras indicadoras y leve SP en ND y PD. Un tercer grupo (40% de los aislados) generó síntomas moderados a severos en LM, presentó algunas reacciones de SY en NA, así como de clorosis foliar y enanismo en ND/NA, SP moderado en PD y leve en ND. El último grupo (35% de los aislados) presentó síntomas moderados y severos en todas las indicadoras, son aislados que provocaron fuertes reacciones de SY en NA y PD,

acentuado enanismo y clorosis foliar en ND/NA, SP moderados a severos en PD y ND, restricciones de crecimiento y nervaduras corchosas en varias indicadoras. Este grupo estaría conformado por aislados de CTV muy severos (Roistacher, 1988; Rocha-Peña et al., 1995), que circulan tanto en el norte como en el sur del país, independientemente de la especie cítrica cultivada, confirmando los resultados obtenidos en pruebas anteriores (Maeso y Bertalmío Com. Pers.).

En cuanto a la clasificación en los grupos biológicos establecidos por Garnsey et al. (2005) los resultados se resumen en el Cuadro 5. En general, se pudo correlacionar la respuesta obtenida por cada aislado con un determinado grupo biológico, aunque algunos aislados no quedaron contemplados en ellos. Como se observa sólo un aislado clasificó en el grupo I, poco virulento con síntomas únicamente en LM; 40% de los aislados se correspondieron con el grupo V expresando síntomas en todas las indicadoras; un aislado perteneció al grupo VII sin reacción de SY en NA y otros al grupo VIII sin respuesta en ND/NA; según Garnsey et al. (2005) algunos síntomas son manifestaciones independientes de patogenicidad y no hay asociación entre ellos.

Cuadro 5. Clasificación de los aislados en grupos biológicos según el patrón de síntomas observados.

Biotipo	Aislado	Reacción en las Indicadoras *				
		Lima	ND/NA	N. Agrio	Pomelo	N.dulce
		SV	DL	SY	SP	SP
I	CAP3	x	0	0	0	0
III ₁	CAP1	x	0	x	0	0
IV ₂	CAP2	x	0	x	x	0
V	AD11	x	x	x	x	x
V	AD6	x	x	x	x	x
V	SACH2	x	x	x	x	x
V	SASA1	x	x	x	x	x
V	SAG6	x	x	x	x	x
V	AD10	x	x	x	x	x
V	AZ1	x	x	x	x	x
V	MIL	x	x	x	x	x
V ₃	AD1	x	0	x	x	x
V ₃	AD8	x	0	x	x	x
V ₃	SACH1	x	0	x	x	x
V ₃	AD3	x	0	x	x	x
VII	CG1	x	x	0	x	x
VIII	MILCH	x	0	0	x	x
VIII	MO15	x	0	0	x	x
VIII	AD12	x	0	0	x	x
VIII ₄	SAG4	x	0	0	0	x

(*) SV: síntomas foliares y acanaladuras en LM, DL: declinamiento en ND/NA evaluado como presencia de clorosis y enanismo, SY: amarillamiento del plantín (seedlings yellows) en NA, SP: acanaladuras (stem pitting) en PD y ND.

1, 2 y 3: los aislados podrían pertenecer a esos biogrupos pero falta la reacción DL (declinamiento) en ND/NA.

4: podría pertenecer al biogrupo VIII, pero falta el síntoma SP en pomelo

Por otra parte, existió poca relación entre los síntomas generados en las indicadoras y el aspecto del árbol en campo. Para este estudio, el 60% de las muestras fueron colectadas de árboles con aspecto normal en campo, sin embargo la mayoría de ellas indujeron SP moderado en PD y ND y reacción de SY en NA, es decir que árboles con aspecto saludable son portadores de variantes severas del virus; en general esto puede ocurrir porque en la planta hay una mezcla de aislados (Garnsey et al., 2005)

que pueden segregarse mediante la inoculación a las indicadoras (Lee y Bransky, 1989). En cambio, la mayoría de los aislados provenientes de árboles con ausencia de vigor mostraron SP moderado o severo en PD y/o ND y SY en NA, confirmando la presencia de cepas severas del virus. Los resultados obtenidos en las pruebas biológicas demuestran el predominio de cepas severas de CTV en el país. Si bien, esto puede tener importante repercusión a nivel productivo, el uso de *P. trifoliata* enmascara esta situación (no se ven síntomas en campo). Además, la presencia de *Toxoptera citricida*, seguramente incide en la prevalencia y distribución de las variantes más severas del virus.

2. Caracterización molecular

Los árboles filogenéticos construidos para cada gen se realizaron considerando la clasificación propuesta por Harper (2013), quien determinó la existencia de seis líneas de CTV: VT, T30, T3, RB, T36, T68 y una posible nueva línea constituida por el aislado HA16-5, cada uno de estos genotipos se corresponde con un clado.

Para la región de p25 se analizaron 18 secuencias de Uruguay, con una longitud de 561 pb. Se obtuvo un árbol con 7 clados definidos, con alto soporte estadístico (Figura 2). El clado del genotipo VT tuvo un apoyo estadístico de 95% y las secuencias 17 y 18 agruparon allí, con la secuencia NZ-M16 (recombinante). Las secuencias 11 y 20 agruparon con las secuencias de referencia del genotipo RB con un soporte estadístico de 69. El 62% de las secuencias uruguayas estudiadas se incluyeron con un valor de bootstrap de 87% en el nuevo clado (NC) descrito por Benítez-Galeano *et al.* (2015) y que fuera citado anteriormente por Harper (2013)

como un posible nuevo genotipo de CTV al no poder clasificar al aislado HA16-5 en ninguno de los clados ya existentes. Iglesias *et al.* (2008) también reportaron que aislados argentinos formaban un clado distante de los demás genotipos de referencia para p25 y p27. Luego, Benítez-Galeano *et al.* (2015) al analizar secuencias uruguayas y argentinas, encontró que varias de ellas agruparon en el clado NC para el gen P25. Esto indicaría que filogenéticamente el virus a nivel regional es muy similar.

Con respecto al gen p20, se trabajó con 12 secuencias uruguayas de 411pb. El árbol presentó 7 clados claramente definidos y con altos valores de bootstrap (Figura 3). Los clados T30, T36, T68 y RB no incluyeron aislados uruguayos. Las muestras 17 y 18 agruparon con las secuencias de referencia del genotipo VT con un soporte estadístico de 97% y la muestra 2 agrupo dentro del NC con apoyo de 99%, mientras que, el 45% de las secuencias uruguayas analizadas para este gen perteneció al cluster del genotipo T3 con un bootstrap de 68%.

En cuanto al gen p23, el árbol filogenético fue construido con 16 secuencias uruguayas de 528pb. Se observó 7 clusters definidos (Figura 4). Las muestras 17, 18, 19 y 21 se agruparon dentro del clado VT, con la secuencia NZ-M16 (recombinante), con 99% de apoyo estadístico. Tres aislados uruguayos estuvieron incluidos en el clado del genotipo T68 con 90% de soporte; la muestra 5 no se pudo clasificar, aunque está más cercana a los genotipos VT y T68. El 33% de las muestras analizadas para este gen se asociaron con secuencias de referencia del genotipo T3. No se observaron, para p23, muestras uruguayas en el clado NC (genotipo HA 16-5).

El estudio de estas tres regiones genéticas permite concluir que la población viral en el país es heterogénea.

Sambade et al. (2003) agrupó molecularmente los aislados según virulencia en: suaves, intermedios y severos. Sí bien, no existe una clara relación genotipo-fenotipo para este virus, la clasificación de Sambade et al. (2003) se puede correlacionar con la clasificación actual de Harper (2013) de la siguiente manera: el genotipo T30 corresponde a aislados suaves, el T36 a los de virulencia intermedia y los genotipos VT, T68, RB y T3 estarían agrupando aislados severos (Biswas et al., 2012). Según esta clasificación nuestros aislados agrupan con aislados severos inductores de SP en ND o PD, o forman un clado aparte de los aislados de referencia internacional. No se encontró ningún genotipo del tipo suave o intermedio, aunque T36 fue reportado en el país (Benítez-Galeano, 2014) y T30 en Argentina (Iglesias et al., 2008). Es de destacar la presencia de secuencias del genotipo RB, con baja frecuencia, en aislados que fueron colectados hace más de 15 años y han permanecido en invernadero sin ser expuestos a intercambio genético, por lo tanto, este genotipo circula en el país desde hace mucho tiempo y los reportes indican que el mismo podría generar una infección sistémica en *P. trifoliata* (Harper et al., 2010; Dawson y Money, 2000), nuestro principal portainjerto.

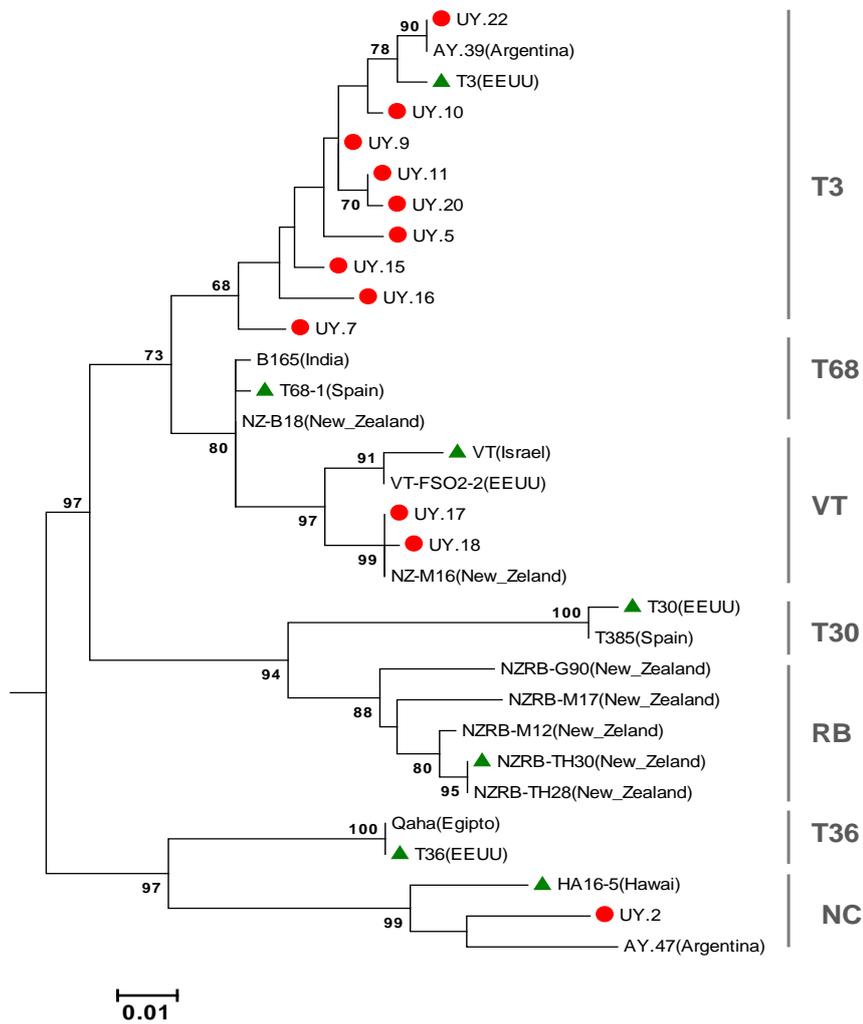


Figura 3. Árbol filogenético para el gen p20.

● Secuencias uruguayas, ▲ Genotipos de referencia, AY: secuencias argentinas, BR: secuencias brasileras.

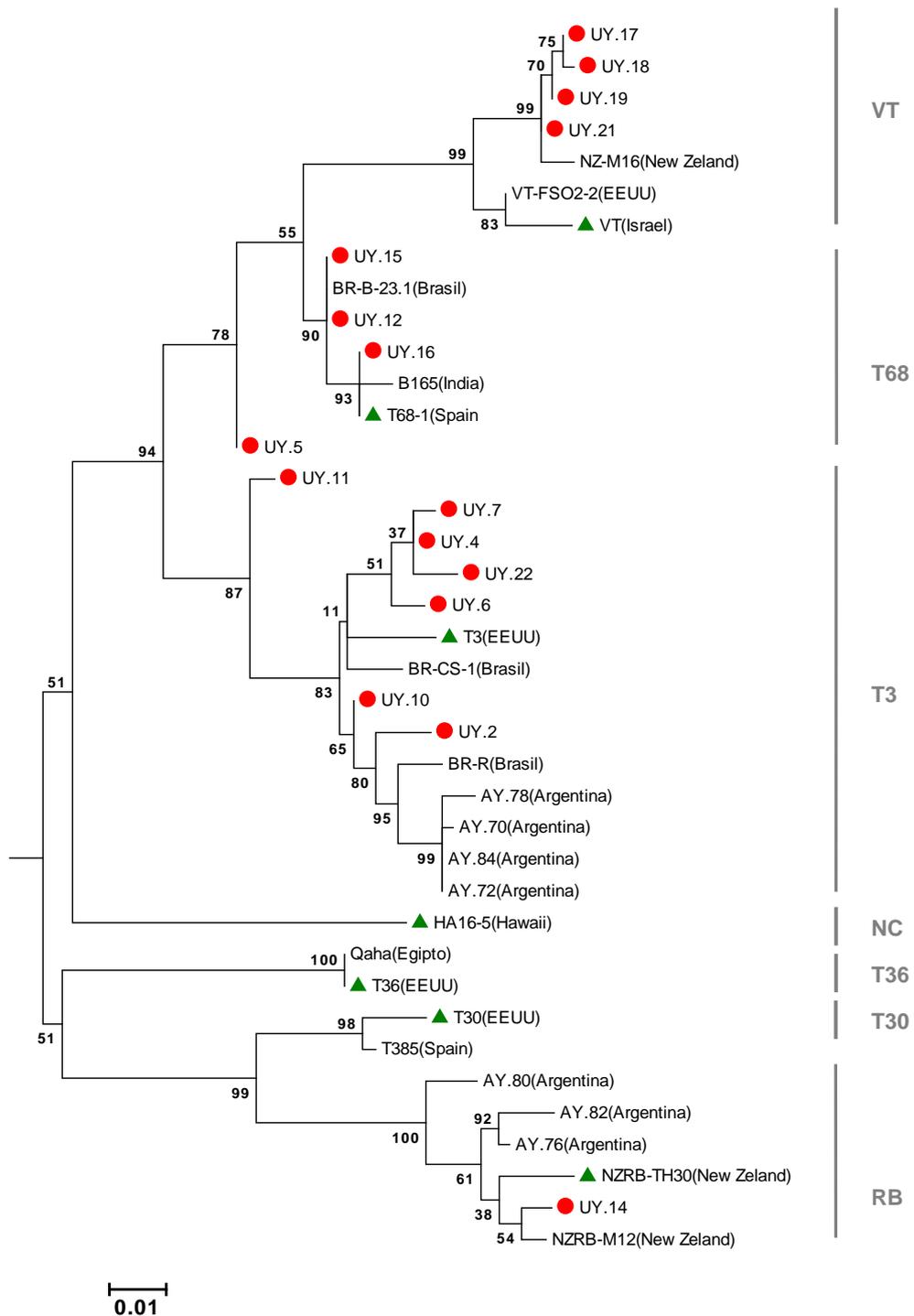


Figura 4. Árbol filogenético para el gen p23.

● Secuencias uruguayas, ▲ Genotipos de referencia, AY: secuencias argentinas, BR: secuencias brasileras.

En cuanto a la composición genética de cada aislado (Cuadro 6), solamente dos aislados (UY17 y UY18) tuvieron una composición homogénea, donde las secuencias mayoritarias agruparon con el genotipo VT; mientras que, la mayoría de los aislados mostraron alta variabilidad inter-génica, situación que también ha sido reportada en Argentina (Iglesias et al., 2008). Esta variabilidad, podría ser explicada por la presencia de infecciones mixtas en una planta (Iglesias et al., 2008; Hilf et al., 1999), fenómeno muy probable en nuestras condiciones ya que las plantas están expuestas a re-infecciones por la coexistencia de los distintos genotipos y el vector en el campo; o a la presencia de genomas recombinantes (Rubio et al., 2001; Weng et al., 2007), evento frecuente en este virus (Harper et al., 2010). La existencia de genomas recombinantes también es probable porque en los genotipos encontrados en el país: T3, T68, RB y NC, se han descripto eventos de recombinación (Harper, 2013), de hecho las muestras que se agruparon dentro del clado VT en los distintos árboles filogenéticos, siempre lo hacen con la secuencia NZ-M16 que es recombinante con el genotipo T3.

Cuadro 6. Genotipos de los aislados uruguayos para los genes p20, p23 y p25*.

Código	Nºmuestra	P20	P23	P25
MO15	UY 2	NC	T3	NC
MILCH 1	UY 3	x	x	NC
AD 10	UY 4	x	T3	NC
CAP 2	UY 5	T3	T68?	NC
CG 1	UY 6	x	T3	xx
SACH 2	UY 7	T3	T3	NC
AZ	UY 8	xx	xx	xx
SASA 1	UY 9	T3	x	NC
FOR 1	UY 10	T3	T3	NC
SACH 1	UY 11	T3	T3	RB
CAP 1	UY 12	xx	T68	NC
CAP 3	UY 13	xx	x	NC
SAG 4	UY 14	xx	RB	NC
SAG 6	UY 15	T3	T68	NC
AD 1	UY 16	T3	T68	NC
AD 3	UY 17	VT	VT	VT
AD 6	UY 18	VT	VT	VT
AD 8	UY 19	xx	VT	NC
AD 11	UY 20	T3	xx	RB?
AD 12	UY 21	x	VT	xx
MIL	UY 22	T3	T3	NC

* x: no amplificó

xx: no se obtuvo secuencia de buena calidad

?: probablemente pertenezca a ese genotipo

Conclusiones

La caracterización biológica permitió diferenciar grupos de aislados que mostraron distinto grado de severidad, no obstante, el 35% de los aislados estudiados presentaron síntomas de SY, ST, SP, VcK, asociados con reacciones de aislados muy severos y el 85% manifestó algún grado de SP en ND y PD. Este resultado es muy importante en nuestras condiciones, ya que el 90% de la citricultura está desarrollada sobre *P. trifoliata* y se considera que por ello la enfermedad no afecta la producción, sin embargo, el potencial productivo podría estar limitado por la infección con aislados severos del virus.

La población viral a nivel genético es diversa, se han encontrado varios genotipos por muestra, lo que ratifica la presencia de infecciones mixtas en una planta, o la posible existencia de genomas recombinantes. Se han determinado molecularmente los genotipos: T3, T68, VT, RB y NC, sí bien actualmente no se vincula el genotipo a la producción de síntomas, según clasificaciones anteriores, éstos genotipos se corresponderían con aislados severos de referencia internacional, coincidiendo con las reacciones observadas en el testaje biológico.

Los estudios realizados indican que en nuestro país, independientemente de la localidad y la especie cítrica predominan aislados severos de CTV. Estos resultados refuerzan la necesidad de implementar un programa de protección cruzada que complemente al programa de saneamiento de cítricos, de modo de llevar al campo plantas saneadas y pre-inmunizadas para CTV; aunque también complejizan la obtención de aislados promisorios.

Agradecimientos

A los Ings. Agrs. Diego Maeso, Ana Bertalmío y Fernando Rivas por la orientación, sugerencias y enseñanzas durante este trabajo. A los Lic. Rodney Colina, María José Benítez y Ana Arruabarrena quienes tuvieron una excelente disposición para enseñarme a trabajar en las técnicas moleculares.

Bibliografía

Bar-Joseph M, Marcus R, Lee R. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291-316.

- Benítez-Galeano M, Rubio L, Bertalmío A, Maeso D, Rivas F, Colina R. 2015. Phylogenetic studies of the three RNA silencing suppressor genes of South American CTV isolates reveal the circulation of a novel genetic lineage. *Viruses*, 2015, 7, 4152-4168.
- Benítez-Galeano M. 2014. Caracterización molecular y filodinámica del virus de la tristeza de los cítricos. [Tesis de maestría]. Universidad de la República, Uruguay. 110p.
- Bentancour C, Scatoni I, Morelli E. 2009. Insectos del Uruguay. Montevideo. Universidad de la República: Facultad de Agronomía - Facultad de Ciencias. 657p.
- Biswas K, Tarafdar A, Sharma S. 2012. Complete genome sequence of mandarine decline Citrus tristeza virus of the northeastern Himalaya hill region of India: comparative analyses determine recombinant. *Archives Virology*, 157: 579-583.
- Broadbent P, Brlansky R, Indsto J. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease*, 80: 329-333.
- Costa A, Müller G. 1980. Tristeza control by cross protection: a U.S.-Brazil cooperative success. *Plant Disease*, 64:538-541.
- Da Graça J, Van Vuuren S. 2010. Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection. In: *Citrus tristeza virus Complex and Tristeza Diseases*. American Phytopathological Society, 247-260.

- Dawson T, Money P. 2000. Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of Citrus tristeza virus in New Zealand. En: Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV); 13-18 setiembre; 2000; San Pablo, Brasil. Riverside: IOCV. pp: 69-76.
- DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. Producción [en línea] En: Anuario estadístico agropecuario 2014. Montevideo: MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca). Consultado en julio 2015. Disponible en: [http://www.mgap.gub.uy/portal/diea/Encuesta citrícola 2014, N°325](http://www.mgap.gub.uy/portal/diea/Encuesta_citricola_2014_N325).
- Francis M, Peyrou M, Perea B, Borde J, Fosali Y. 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.
- Garnsey M, Civerolo E, Gumpf D, Paul C, Hilf M, Lee R, Brlansky R, Yokomi R, Hartung J, 2005. Biological characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. En: Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCV); 7-12 noviembre; 2004; Monterrey, México. Riverside: IOCV. pp: 75-93.
- Garnsey S, Gumpf D, Roistacher C, Civerolo E, Lee R, Yokomi R, Bar-Joseph M. 1987. Toward standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica*, 19:151-157.
- Harper S. 2013. Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, 4(93):1-18.

- Harper S, Dawson T, Pearson M. 2010. Isolates of Citrus tristeza virus that overcome Poncirus trifoliata resistance comprise a novel strain. Archives Virology, 155: 471-480.
- Hermoso de Mendoza A, Ballester-Olmos J, Pina J. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. En: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV); 9-13 mayo; 1983; Argentina. Riverside: IOCV. pp: 23-27.
- Hilf M, Karasev A, Albiach-Marti M, Dawson W, Garnsey S. 1999. Two paths of sequence divergence in the Citrus tristeza virus complex. Phytopathology, 89:336-342
- 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.
- 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 N° 106, 65p.
- Lee R., Brlansky R. 1989. Variation in the severity of Citrus Tristeza Virus isolates from groves whit quick decline. Proceeding Florida State Horticultural Society, 102: 1-3.
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti M, Guerri J, Peña L. 2008. Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Molecular Plant Pathology, 9:251-268.
- Muller I, Campiglia. 1981. Investigaciones Agronómicas año2, n°1.

- Müller G, Costa A. 1987. Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica*, 19:197-198.
- Rocha-Peña M, Lee R, Lastra R, Niblett C, Ochoa-Corona F, Garnsey S, Yokomi R. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease*, 79:437- 443.
- Roistacher C, Da Graça J, Müller G. 2010. Cross Protection Against Citrus Tristeza Virus a Review. En: Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV); 7-12 noviembre; 2007; Adana, Turkía. Riverside: IOCV. pp: 1-27.
- Roistacher C. 1988. Observations on the decline of sweet orange trees in coastal Peru caused by stem-pitting tristeza. *Plant protection bulletin, India* 36: 19-26.
- Rubio L, Ayllon M, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P, Falk B. 2001. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75:8054-8062.
- 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. *Archives of Virology*, 148:2325-2340.
- Weng Z, Barthelson R, Gowda S, Hilf ME, Dawson WO, Galbraith DW. (2007) Persistent Infection and Promiscuous Recombination of Multiple Genotypes

of an RNA virus within a Single Host Generate Extensive Diversity. PLoS ONE, 2(9): 917.

