



**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Sub-área Biología Celular y Molecular  
PEDECIBA**

**VIRUS Y VIROIDES EN LA CITRICULTURA DEL URUGUAY:  
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR, BIOLÓGICA Y EVOLUTIVA  
DE SUBAISLADOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS  
CÍTRICOS**

**Estudiante: MSc. María José Benítez Galeano**

**Orientador: Rodney Colina, PhD**

**Co-orientador: Gonzalo Moratorio, PhD**

**Co-orientador: Ing. Agr. Fernando Rivas, PhD**



Tesis presentada al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas como  
requisito para la obtención del título de Doctora en Ciencias Biológicas

Integrantes del tribunal:

---

**Héctor Romero, PhD**

---

**Sabina Vidal, PhD**

---

**Santiago Mirazo, PhD**



# ÍNDICE

Resumen .....	6
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	<b>9</b>
1.1. La citricultura en Uruguay .....	10
1.2. Patógenos de cítricos .....	11
1.2.1. Viroides .....	13
1.2.1.1. <i>Hop stunt viroid</i> (HSVd) .....	15
1.2.1.2. <i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd) .....	16
1.2.1.3. <i>Citrus dwarfing viroid</i> (CDVd) .....	16
1.2.1.4. <i>Citrus bent leaf viroid</i> (CBLVd) .....	16
1.2.1.5. <i>Citrus bark cracking viroid</i> (CBCVd) .....	17
1.2.2. <i>Satsuma dwarf virus</i> (SDV) .....	18
1.2.3. <i>Citrus psorosis virus</i> (CPSV) .....	20
1.2.4. <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV) .....	22
1.3. Relevancia de la investigación .....	28
1.4. HIPOTESIS .....	30
1.5. OBJETIVO GENERAL .....	30
<b>2. CAPÍTULO 1: DE VIRUS Y VIROIDES .....</b>	<b>31</b>
2.1. Objetivos específicos .....	31
2.2. Benítez-Galeano <i>et al.</i> 2021_First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay .....	32
2.3. Benítez-Galeano <i>et al.</i> 2017_The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the NC lineage of CTV.....	43
<b>3. CAPÍTULO 2: CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA, MOLECULAR Y EVOLUTIVA DE SUBAISLADOS DE CTV .....</b>	<b>53</b>
3.1. Objetivos específicos .....	53
3.2. Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> 2019_Diversity of Uruguayan CTV populations segregated after single aphid transmission .....	54
3.3. Benítez-Galeano <i>et al.</i> 2018_Complete genome sequence of a novel recombinant CTV: a RB isolate from Uruguay .....	66

3.4. Benítez-Galeano <i>et al.</i> Caracterización biológica, molecular y evolutiva de subaislados de CTV obtenidos mediante transmisión por único áfido (Manuscrito en preparación) .....	69
4. DISCUSIÓN GENERAL .....	101
5. BIBLIOGRAFÍA GLOBAL .....	105
6. PERSPECTIVAS .....	113
7. ARTÍCULOS EN COLABORACIÓN VINCULADOS CON CTV	
7.1. Hernández-Rodríguez <i>et al.</i> 2017_First report of the CTV trifoliolate RB genotype in 'Newhall' sweet orange in South America .....	114
7.2. Rubio <i>et al.</i> 2019_Biological and molecular characterization of Uruguayan CTV field isolates .....	115
7.3. Llanes-Alvarez <i>et al.</i> 2021_Prevalence of mild CTV isolates of the T30 genotype in Cuban commercial citrus fields after the dissemination of HLB .....	116
8. ARTÍCULOS NO RELACIONADOS CON LA TESIS	
8.1. Mir <i>et al.</i> 2021_Recurrent dissemination of SARS-CoV-2 through the Uruguayan-Brazilian border .....	117
8.2. Rego <i>et al.</i> , 2021_Real-time genomic surveillance for SARS-CoV-2 variants of concern, Uruguay .....	118
9. ANEXO 1. Comandos utilizados en el análisis de datos de los subaislados DSST-13, -17 y -25 .....	119

## Resumen

En el último medio siglo, la industria citrícola en Uruguay ha tenido un fuerte impacto socio económico, manteniéndose competitiva en los mercados mundiales mediante la introducción de nuevas variedades y el mejoramiento en las prácticas de producción para la obtención de predios altamente productivos. Según datos del MGAP - DIEA, la producción de naranjas, mandarinas, limones y pomelos de la zafra 2020 fue de 218.671 toneladas, generando ingresos por valor de 72 millones de dólares y más de 20.000 puestos de trabajo.

Debido a la homogeneidad genética de los cultivos, producto de la selección de rasgos económicamente valiosos, las distintas especies de cítricos son susceptibles a agentes patógenos que impactan negativamente en la producción. Las distintas enfermedades son de etiología múltiple (hongos, bacterias, virus, viroides, protozoos) y se caracterizan por disminuir el vigor de los árboles afectados, así como su vida útil, conduciéndolos a producir fruta de menor calibre y calidad, y producciones menores; incluso pueden provocar la muerte de los árboles afectados. Algunos de los virus y viroides responsables de dichas afecciones son el *citrus tristeza virus* (CTV), *citrus psorosis virus* (CPsV), *satsuma dwarf virus* (SDV), *citrus exocortis viroid* (CEVd), *hop stunt viroid* (HSVd), *citrus dwarfing viroid* (CDVd), *citrus bark cracking viroid* (CBCVd) y *citrus bent leaf viroid* (CBLVd).

El control de las enfermedades causadas por CPsV, SDV y los viroides previamente mencionados, se logra realizar mediante el saneamiento y certificación de plantas a liberar a campo. En cambio, debido a la naturaleza y estructura poblacional de virus de RNA, la enfermedad causada por CTV requiere mecanismos más complejos de control, como la protección cruzada (PC). La existencia de variantes genéticas de CTV con diversos grados de severidad coexisten en una misma planta, formando complejas poblaciones virales (cuasiespecies) con diferentes características biológicas. A su vez, la transmisión por áfidos juega un papel crucial en la evolución de las cuasiespecies, ya que fuerza a las poblaciones a pasar por cuellos de botella transmitiendo efectivamente una pequeña proporción de la diversidad poblacional. Desde el punto de vista experimental, la transmisión por áfidos ha sido crucial para la separación de genotipos en las poblaciones de CTV, y poblaciones homogéneas del genotipo a controlar son esenciales para que la PC funcione.

En el presente trabajo nos planteamos mapear, por primera vez a nivel país, la incidencia y distribución de virus y viroides que afectan los cultivos de cítricos del Uruguay, ya que constituye el paso principal para el desarrollo de sistemas de control efectivos para su manejo. A su vez, nos propusimos realizar la caracterización biológica, molecular y evolutiva de tres subaislados de

CTV, obtenidos de un aislado de campo a partir de transmisión por un sólo áfido (SAT), con el objetivo de brindar información fundamental para el desarrollo de la PC en el país y conocer la patogénesis del virus que varía de acuerdo a las variantes minoritarias presentes en la muestra. , como se ha demostrado para los virus RNA,

Se pusieron a punto distintas PCRs cualitativas y cuantitativas, y se analizaron 1175 muestras colectadas al azar a lo largo de las zonas citrícolas norte y sur del país, incluyendo las especies y variedades económicamente más relevantes. Los análisis de detección molecular mostraron que solamente el 6% de las muestras analizadas fueron negativas para todos los patógenos en estudio, mientras que el 93% fueron positivas para CTV. Cabe destacar que el virus SDV y los viroides CBLVd y CBCVd no fueron detectados. Las coinfecciones se detectaron de manera frecuente, encontrando plantas con hasta cuatro patógenos al mismo tiempo y con la presencia de CTV en todas ellas. De acuerdo al análisis filogenético de CTV, basado en regiones parciales del genoma, se detectaron 5 de los 8 genotipos descritos hasta el momento. El genotipo más prevalente fue el HA16-5 con una frecuencia de detección de 87%, seguido de los genotipos T68, VT y RB. Mediante análisis filogeográficos y de coalescencia, basados en el gen de la cápside viral, se logró determinar el patrón de distribución geográfica del genotipo más prevalente y su año de ingreso a Uruguay.

En cuanto a la caracterización de los tres subaislados obtenidos mediante SAT, se lograron obtener los genomas completos mediante NGS y se observó que dos de ellos presentan un único genotipo (RB, Resistance-Breaking) mientras que el tercero está coinfectado por dos genotipos (VT y RB). Cabe destacar que la sintomatología de las plantas infectadas con el subaislado coinfectado fue más severa que en los casos de mono-infección. También se logró determinar que la estructura del genotipo RB presente en los tres subaislados es recombinante y presenta una similitud nucleotídica y aminoacídica de 99.9% entre subaislados. Sin embargo, la similitud entre los genotipos RB y VT fue de 68.1% a nivel de nucleótidos (nt) y 80.8% a nivel de aminoácidos. También se lograron caracterizar los cambios sinónimos, no sinónimos y no codificantes de los tres subaislados, así como reconstruir las redes de haplotipos basados en estos cambios.

En suma, esta tesis brinda el primer reporte exhaustivo sobre la epidemiología molecular de varios virus y viroides que afectan a los cítricos de nuestro país, incluyendo los genotipos más prevalentes de CTV. Esta información destaca la importancia de mantener la vigilancia epidemiológica sobre estos patógenos, ya que contribuye en una mejora en la producción citrícola nacional, redundando en una mejora económica para el país. A su vez, aportó información fundamental sobre la caracterización biológica, molecular y evolutiva de subaislados del genotipo RB de CTV. Esta información representa un gran aporte para el desarrollo de la PC como mecanismo de control del virus en el país.





## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los cítricos y sus derivados son fuente de vitaminas, minerales y fibra alimentaria, esenciales para el bienestar nutricional. Además del consumo como jugo o fruta fresca, los cítricos se producen para la obtención de aceites esenciales y ácido cítrico, y los subproductos son utilizados como alimento para animales entre otros. Considerado un *commodity*, es uno de los cultivos frutales más importantes a nivel económico en el mundo. Este cultivo se originó en el sureste asiático y actualmente se extiende por más de 140 países de las zonas tropicales y subtropicales del planeta, abarcando más de 8.7 millones de hectáreas (ha) con una producción aproximada de 143 millones de toneladas (Libro Anual Estadístico 2020, FAO, <https://www.fao.org/3/cb6492en/cb6492en.pdf>). Las especies más cultivadas son las naranjas, con más de la mitad de la producción mundial, seguidas de mandarinas, limones y pomelos.

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

A lo largo de la historia, la utilización de distintos pies ha estado condicionada en buena medida por la aparición y dispersión de distintos patógenos. Las epidemias ocurridas en el siglo XIX por oomicetes del género *Phytophthora* dieron lugar a la utilización casi exclusiva del naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) como patrón, dada su resistencia a la enfermedad producida por este patógeno y a sus buenas cualidades agronómicas. Sin embargo, con la aparición de la enfermedad conocida como Tristeza, causada por el Virus de la Tristeza de los Cítricos (*Citrus*

Tristeza Virus, CTV), ocurrió la destrucción masiva de estas plantaciones. Es así que en la actualidad la especie *Poncirus trifoliata* y los híbridos citrange Carrizo y Troyer, son los portainjertos más utilizados por su tolerancia al decaimiento causado por CTV y por la buena calidad de fruta que inducen en las variedades (Moreno *et al.*, 2008; Roistacher *et al.*, 2010).

### **1.1. La Citricultura en Uruguay**

En Uruguay, la citricultura es un rubro con un fuerte impacto socio-económico y constituye un sector exportador en expansión; el de mayor importancia dentro del rubro hortifrutícola. En el año 2020, la producción de cítricos alcanzó un total de 218.671 toneladas, con ingresos del orden de los 72 millones de dólares. La distribución de la producción por especie cítrica correspondió a un 40,5% de naranjas, 34,6% de mandarinas, 24,6% de limones y 0,3% de pomelos. Actualmente, son ocho las empresas con más de 400 ha cada una, responsables del 62% de la producción nacional, mientras que el 64% de los establecimientos constan de menos de 10 hectáreas de citrus y explican solamente el 4% de lo producido (Anuario OPYPA 2020). La importancia socio-económica del rubro en nuestro país es destacada dado que la zafra citrícola involucra más de 20.000 puestos de trabajo.

La citricultura del Uruguay abarca 14.587 ha, con 6.209.287 plantas en producción distribuidas en el 87% de la superficie total. Se distinguen claramente dos regiones donde se concentra la producción de citrus. La zona norte o litoral Norte involucra plantaciones en los departamentos de Salto, Paysandú y Artigas, y es la región citrícola por excelencia, concentrando el 91% de la producción citrícola nacional. Por otro lado, la zona sur comprende los departamentos de Colonia, San José, Montevideo y Canelones, abarcando el 9% restante de la producción nacional, principalmente limón (Anuario OPYPA 2020).

En los últimos años, dado los cambios en la demanda internacional, existe un importante recambio en el número de plantas por especie. Se redujo un 15% el número de plantas de naranjas y pomelos, hubo un leve incremento en las plantas de mandarinas (4%) y un fuerte incremento en el número de plantas de limón, que

aumentó un 77% en el último quinquenio. A partir del año 2019 la especie con mayor número de plantas es la mandarina, debido tanto a plantaciones nuevas como a cambios de copa de árboles de naranja.

## **1.2. Patógenos de cítricos**

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

Las enfermedades de mayor importancia son aquellas cuya vía de transmisión es el injerto, siendo los agentes responsables parásitos intracelulares tales como bacterias, virus y viroides que se propagan junto con el material vegetal. Sin embargo, existen enfermedades que presentan vías de propagación adicionales, como la transmisión mecánica por herramientas de corte o a través de insectos vectores del patógeno, mecanismos de gran impacto en la dispersión de los agentes infecciosos que dificulta enormemente su control.

En tanto que las enfermedades transmisibles por injerto se logran controlar fácilmente mediante saneamiento y certificación del material vegetal a propagar, las enfermedades propagadas mediante insectos vectores requieren un abanico de medidas de control que dependen de la incidencia del patógeno y las variedades cítricas afectadas en cada zona específica (Navarro, 1993). Este abanico incluye por un lado medidas preventivas, como el control sanitario del material vegetal propagativo mediante programas de saneamiento, cuarentena y certificación, y la erradicación de plantas infectadas o el control biológico de los vectores. En Uruguay, el Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos (PNSCC), comenzó en el año 1990 y continuó ininterrumpidamente hasta el año 2004, donde tuvo un receso y fue retomado nuevamente en el año 2010 (Maeso & Bertalmío, 2002). Sin embargo, no fue hasta el 2014 que se estableció la obligatoriedad del uso de material certificado por el PNSCC, que brinda plantines libres de los patógenos CTV, CPsV, CEVd y HSVd a los productores.

Por otro lado, para algunos patógenos (caso del CTV), se pueden implementar otras tecnologías de control, como la protección cruzada (PC), necesarias cuando la diseminación del patógeno es muy amplia o los portainjertos utilizados en los cultivos son susceptibles a alguna variante del patógeno. La PC se describe como un fenómeno en el que una planta muestra resistencia completa o parcial a una cepa de un virus o viroide, luego de haber sido infectada con una cepa suave o atenuada del mismo patógeno (Gal-On & Shibolet, 2005; Yoon *et al.*, 2006).

**Tabla 1.** Resumen de las características generales de los patógenos a considerar en esta tesis.

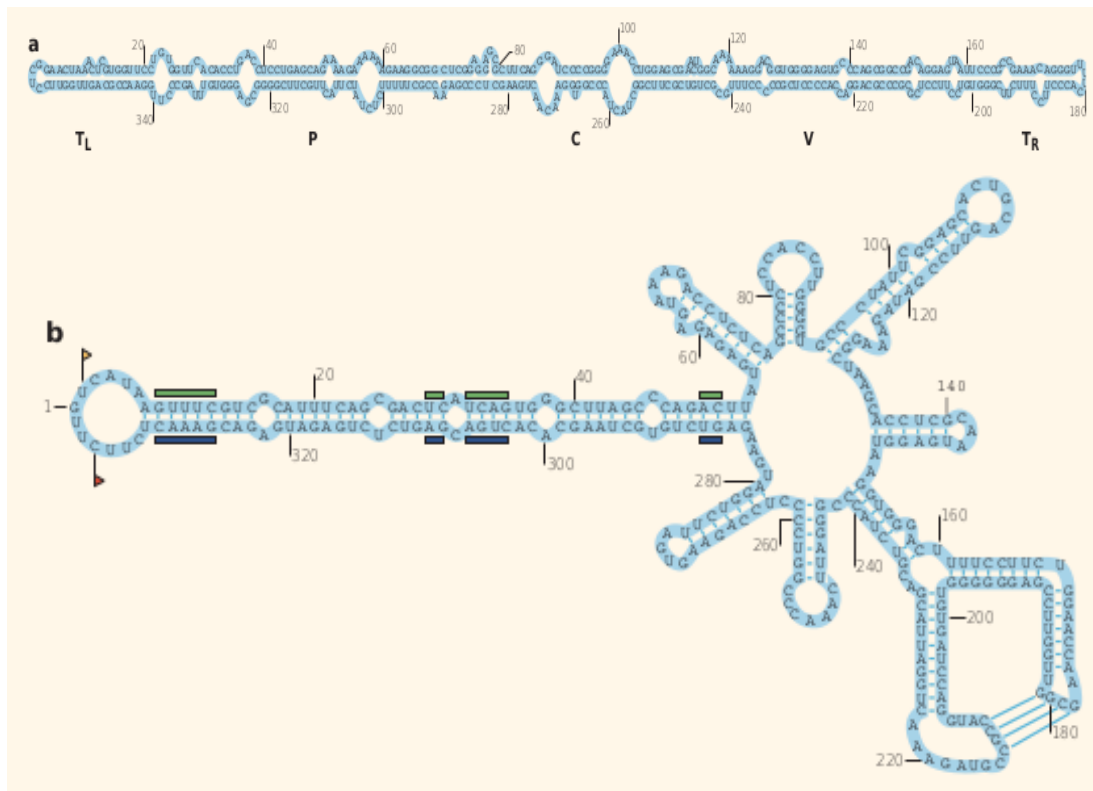
	VIROIDES					VIRUS		
	<i>Hop Stunt Viroid (HSVd)</i>	<i>Citrus Exocortis Viroid (CEVd)</i>	<i>Citrus Dwarfing Viroid (CDVd)</i>	<i>Citrus Bent Leaf Viroid (CBLVd)</i>	<i>Citrus Bark Cracking Viroid (CBCVd)</i>	<i>Satsuma Dwarf Virus (SDV)</i>	<i>Citrus Psorosis Virus (CPsV)</i>	<i>Citrus Tristeza Virus (CTV)</i>
Familia	Pospiviroidae					Secoviridae	Aspiviridae	Closteroviridae
Género	<i>Hostuviroid</i>	<i>Pospiviroid</i>	<i>Apscaviroid</i>	<i>Apscaviroid</i>	<i>Cocadviroid</i>	<i>Sadwavirus</i>	<i>Ophiovirus</i>	<i>Closterovirus</i>
Genoma	ssRNA circular covalentemente cerrado					ssRNA+; bipartito	ssRNA-; tripartito	ssRNA+
	295 - 302 nts	371 - 375 nts	294 - 297 nts	318 y 327 nts	284 nts / recombinante HSVd:CEVd	RNA1 7.0 kb / RNA2 5.4 kb	RNA1 8.2 kb / RNA2 1.6 kb / RNA3 1.5 kb	19.3kb
Enfermedad	Cachexia o Xiloporosis	Exocortis	Enanismo	Hoja curvada	Corteza agrietada	Enanismo	Psorosis	Tristeza / Stem Pitting / Seedling Yellows
Sintomas	goma y amarronamiento de tejidos en la unión injerto-pie. Clorosis, retraso del crecimiento.	escamas y grietas verticales en la corteza, enanismo	enanismo generalizado y disminución en la producción de fruta	reducción leve del crecimiento y del volumen de la copa, picaduras en la corteza	agrietamiento severo de la corteza, picaduras gomosas en trifolios y sus híbridos	enanismo, hojas en forma cuchara, calidad y cantidad de fruta disminuida.	descamación del tronco y ramas principales. Tinción de la madera en las áreas lesionadas	necrosis de células del floema debajo de la unión injerto-pie; acanaladuras en la madera; clorosis; enanismo.
Distribución	Amplia.	Amplia	Amplia. Estructuración geográfica.	Baja	Baja	Baja	Amplia	Amplia
Transmisión	Vegetativa. Herramientas de corte.					Vegetativa. Herramientas de corte.		Insecto Vector. Vegetativa. Herramientas de corte.

A continuación se realizará una breve descripción más detallada de los patógenos involucrados en la presente tesis.

### 1.2.1. Viroides

Los viroides fueron descritos por Theodor O. Diener hace más de 50 años y son los ácidos nucleicos infecciosos y autónomos más simples conocidos hasta el momento, con un genoma aproximadamente 10 veces más pequeño que el del virus RNA más pequeño, y se encuentran restringidos al reino vegetal (Diener, 1971; 2003). Mientras que los virus aportan la mayoría de la información genética requerida para su replicación, los viroides se consideran “parásitos obligados de la maquinaria transcripcional de la célula hospedera”, y aunque los síntomas que inducen en las plantas son similares a los que producen sus virus acompañantes, los viroides tienen características estructurales, funcionales y evolutivas únicas (Flores *et al.*, 2005; Owens, 2008). Se componen de un RNA simple hebra, circular covalentemente cerrado, no codificante, con una elevada estructuración secundaria, y con replicación autónoma (Flores *et al.*, 2005). No presentan cápside proteica, su tamaño varía entre 250 y 400 nt, y dependen de la secuencia de RNA o de motivos estructurales para interactuar con proteínas del hospedero mediando así la invasión, replicación, dispersión y evasión de barreras de defensa impuestas por el hospedero (Flores *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2020).

Se clasifican en dos familias de acuerdo a sus propiedades biológicas y moleculares: *Pospiviroidae* que incluye cinco géneros y *Avsunviroidae* con tres géneros (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Los miembros de la familia *Pospiviroidae*, a la cual pertenecen los viroides que infectan cítricos, presentan morfología de varilla con cinco dominios estructurales (terminal izquierdo, patogénico, central, variable y terminal derecho) y una región central conservada (CCR) con un dominio central (Fig. 1a); carecen de actividad ribozima y la replicación ocurre en el núcleo mediante el mecanismo de círculo rodante asimétrico. Por otro lado, los miembros de la familia *Avsunviroidae* carecen de una CCR, son capaces de autoclivarse en ambas hebras mediante ribozimas "cabeza de martillo" y se replican en los cloroplastos por el mecanismo de círculo rodante simétrico (Fig. 1b) (Flores *et al.*, 2005).



**Figura 1. Estructura secundaria de los viroides.** a. Miembro tipo de la familia *Pospiviroidae*. Se indican los dominios estructurales/funcionales: terminal izquierdo (TL), patogénico (P), central (C), variable (V) y terminal derecho (TR). b. Miembro tipo de la familia *Avsunviroidae*. En ambas familias se observa la elevada complementariedad de bases entre hebras, lo que provoca la generación de estructuras secundarias altamente complejas. Tomado de Diener, 2003.

El diagnóstico de los viroides de cítricos se realiza mediante caracterización biológica, utilizando como planta indicadora el cidro Etrog (*Citrus medica* L.), pero a pesar de ser un método confiable y sensible, requiere la incubación de la planta por varios meses a 28-30°C (Bernad & Durán-Vila, 2006). Actualmente, se han desarrollado diversos métodos de análisis molecular para la detección y clasificación de estos agentes, y como son de pequeño tamaño, el genoma completo puede ser amplificado en una única reacción de RT-PCR (Yang *et al.*, 1992; Ragozzino *et al.*, 2004; Bernad & Durán-Vila, 2006).

Los cítricos son hospederos naturales de 8 de las 35 especies descritas de viroides: *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd), *Citrus viroid V* (CVd-V), *Citrus viroid VI* (CVd-VI) y *Citrus viroid VII* (CVd-VII)

(Vernière *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2008; Chambers *et al.*, 2018); en la presente tesis se trabajó con los cinco primeros.

Estos agentes se transmiten mediante injerto o herramientas de corte infectadas. En nuestra región, principalmente en los países que limitan con Uruguay, el reporte de viroides cítricos mantiene la misma tendencia de distribución (Pagliano *et al.*, 2000). En el estado de San Pablo, Brasil, se detectó la presencia de tres de estos viroides (CEVd, HSVd y CDVd) en bloques de plantas madre de categoría fundación, sin evidenciar la presencia de CBLVd y CBCVd. Resultados similares fueron reportados para Concordia, Argentina (Plata *et al.*, 2002). En Uruguay, han sido reportadas cuatro especies de viroides cítricos (CEVd, CBLVd, HSVd y CDVd) a partir de cidros inoculados con aislados de campo, sPAGE e hibridaciones Dot blot y Northern blot de este mismo tejido, no detectándose el CBCVd. Los aislados se obtuvieron mediante un relevamiento de plantaciones nacionales de las zonas de Paysandú, Salto, Canelones y San José (Pagliano *et al.*, 1998; 2000). Debido al reporte reciente de los CVd-V y CVd-VI, hasta el momento no se ha realizado el diagnóstico de estos viroides en el país.

#### **1.2.1.1. Viroide del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*, HSVd)**

HSVd, previamente llamado CVd-II, es el único miembro del género *Hostuviroid* (Semancik & Weathers, 1972; Zhou *et al.*, 2020). Se han reportado variantes genéticas con motivos específicos de secuencia, que varían entre 295-302 nt, responsables de diferencias en la patogenicidad (Reanwarakorn & Semancik, 1998). Las variantes CVd-IIb y CVd-IIc causan la enfermedad conocida como Cachexia o Xyloporosis y presentan entre ellas una diferencia de 6 nts en el dominio variable ("*cachexia expression motif*") (Reanwarakorn & Semancik, 1998; 1999; Palacio-Bielsa *et al.*, 2004). Es una enfermedad que afecta principalmente a las mandarinas y al lúpulo y se caracteriza por presencia de goma y amarronamiento de tejidos como el floema, picaduras y canchales en la madera, principalmente en la unión injerto-pie (Roistacher *et al.*, 1973). Los árboles afectados presentan clorosis y retraso en el crecimiento, y la planta puede llegar a morir (Durán-Vila & Semancik, 2003). HSVd se ha reportado en la mayoría de las zonas citrícolas del mundo (EPPO 2022 <https://gd.eppo.int/taxon/HSVdoo/distribution>).

#### **1.2.1.2. Viroide de la exocortis de los cítricos (*Citrus exocortis viroid*, CEVd)**

Se ha demostrado que CEVd es el agente etiológico causante de la exocortis de los cítricos, mediante la verificación de los postulados de Koch en *Poncirus trifoliata* (Vernière *et al.*, 2004). CEVd pertenece al género *Pospiviroid* y el genoma consiste de una molécula con diferentes variantes de secuencia comprendidas entre los 371-375 nt que afectan el desarrollo de síntomas (Semancik *et al.*, 1972; 1988; Flores *et al.*, 2005). La Exocortis se manifiesta como la aparición de escamas y grietas verticales en la corteza, manchas amarillas en los brotes tiernos y enanismo en especies sensibles. Los aislados severos inducen clorosis, epinastia y rugosidad en las hojas, retardo en el crecimiento y necrosis en pecíolos y vena central, pudiendo llegar a causar la muerte del árbol (Durán-Vila & Semancik, 2003; Flores *et al.*, 2005). CEVd presenta una elevada distribución mundial (EPPO 2022 <https://gd.eppo.int/taxon/CEVDoo/distribution>).

#### **1.2.1.3. Viroide del enanismo de los cítricos (*Citrus dwarfing viroid*, CDVd)**

El viroide del enanismo de los cítricos, previamente llamado *Citrus viroid III* (CVD-III), pertenece al género *Apscaviroid* y presenta un genoma con un tamaño que varía entre 294-297 nt, reportándose 2 variantes genéticas (CVD-IIIa y CVD-IIIb) (Zhou *et al.*, 2020). El nombre hace referencia a la patología que provoca, causando enanismo generalizado y disminución en la producción de fruta en plantas injertadas sobre *P. trifoliata*, citrange o citrumelo (Vernière *et al.*, 2004). En cidro Etrog, CDVd induce epinastia generalizada en las hojas y caída de las hojas causada por el doblar de los pecíolos y necrosis de la vena central (Durán-Vila & Semancik, 2003). Se han reportado variantes de CDVd en la mayoría de las regiones cítricas del mundo que mantienen la variabilidad genética estructurada geográficamente (Zhou *et al.*, 2020).

#### **1.2.1.4. Viroide de la hoja curvada de los cítricos (*Citrus bent leaf viroid*, CBLVd)**

El viroide de la hoja curvada de los cítricos, antiguamente conocido como *Citrus viroid I* (CVD-I), debe su nombre a la sintomatología que produce en el indicador



cidro Etrog. Pertenece al género *Apscaviroid* y al momento se han reportado tres variantes (CVd-Ia, CVd-Ib y CVd-I-LSS), las cuales poseen un tamaño de 327 nts, 318 nts y 327 nts, respectivamente (Ito *et al.*, 2002). En naranjos trifoliados, CBLVd está asociado con reducción leve del crecimiento y del volumen de la copa, así como picaduras en la corteza (Vernière *et al.*, 2006). La baja distribución y ocurrencia de CBLVd se mantiene constante y refuerza la disminuída aparición de este viroide a nivel mundial (Malfitano *et al.*, 2005).

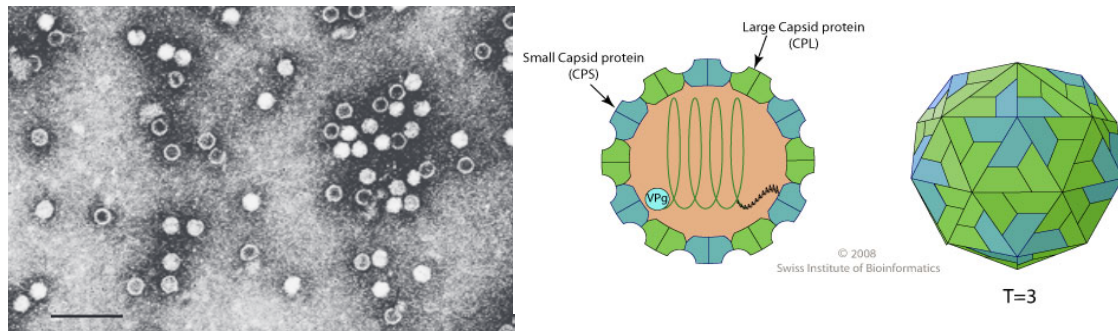
#### **1.2.1.5. Viroide de la corteza agrietada de los cítricos (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd)**

CBCVd, previamente conocido como Citrus viroid IV (CVd-IV), pertenece al género *Cocadviroid* y fue renombrado debido a los síntomas que causa en las especies relacionadas al género *Poncirus*. CBCVd, el más pequeño de los viroides cítricos, presenta un genoma de 284 nts altamente conservado considerado recombinante entre los viroides CEVd y HSVd, lo que explica el amplio rango de hospedero que incluye cítricos y sus especies emparentadas, lúpulos, y plantas herbáceas como pepino, tomate, berenjena y crisantemos (Puchta *et al.*, 1991; Semancik & Vidalakis, 2005). CBCVd ha sido asociado con el agrietamiento severo de la corteza y picaduras gomosas en trifolios y sus híbridos (Vernière *et al.*, 2006), pudiéndose confundir incluso con los síntomas provocados por el CEVd. A pesar de afectar el tamaño de árboles injertados sobre citrange Carrizo, las plantas infectadas con CBCVd producen buena cantidad de fruta, por lo que este viroide se ha utilizado para controlar el tamaño de los árboles en plantaciones de alta densidad (Vidalakis *et al.*, 2011). CBCVd es considerado como un patógeno de baja distribución mundial (EPPO, 2022 <https://gd.eppo.int/taxon/CBCVDo/distribution>)

### 1.2.2. Virus del enanismo de Satsuma (*Satsuma dwarf virus, SDV*)

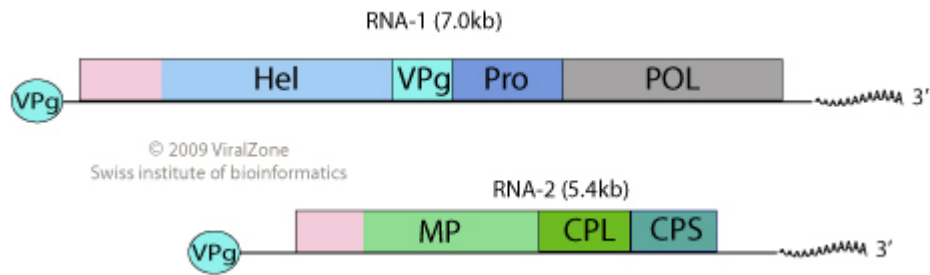
SDV es la especie tipo del género *Sadwavirus* dentro de la familia *Secoviridae*, única familia perteneciente al orden de los *Picornavirales* (Sanfaçon *et al.*, 2009). SDV fue detectado inicialmente en los años 30, pero no fue hasta 1952 en Japón que se confirmó como agente etiológico del enanismo de Satsuma (Yamada & Sawamura, 1952).

Presenta un genoma bipartito de RNA simple cadena de polaridad positiva (Iwanami *et al.*, 1999). Los viriones son partículas icosaédricas de 25-30 nm de diámetro, compuestos por dos CPs, CPL de 42 kDa y CPS de 22 kDa, y sin envoltura (Fig. 2) (Iwanami *et al.*, 1999; 2010; Zhou *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Micrografía electrónica de partículas de SDV (Izquierda, tomado de Iwanami, 2010). Esquema de la estructura icosaédrica de los viriones de SDV (derecha, tomado de ViralZone).

Cada RNA presenta una proteína VPg en su extremo 5', una región poli-A en su extremo 3' y producen largas poliproteínas que luego son clivadas por proteasas virales (Fig. 3) (Sanfaçon *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Esquema de la estructura del genoma bipartito de SDV. Se destacan las proteínas VPg en los extremos 5', las colas poli-A en los extremos 3' y los ORFs con las respectivas proteínas codificadas en recuadros (Tomado de ViralZone).

La enfermedad se propaga lentamente en las quintas en forma de círculos concéntricos (Zhou *et al.*, 2020). La principal vía de transmisión del virus es la propagación vegetativa (Iwanami, 2010). También se ha observado la dispersión natural del virus a través del suelo, sugiriendo como candidatos de vector biológico hongos del género *Olpidium* o algún nemátodo (Zhou *et al.*, 2020). Actualmente, SDV se encuentra presente en varias regiones de Japón, China, Corea del Norte, Corea del Sur, Irán y Turquía (EPPO, 2022; <https://gd.eppo.int/taxon/SDVooo/distribution>).

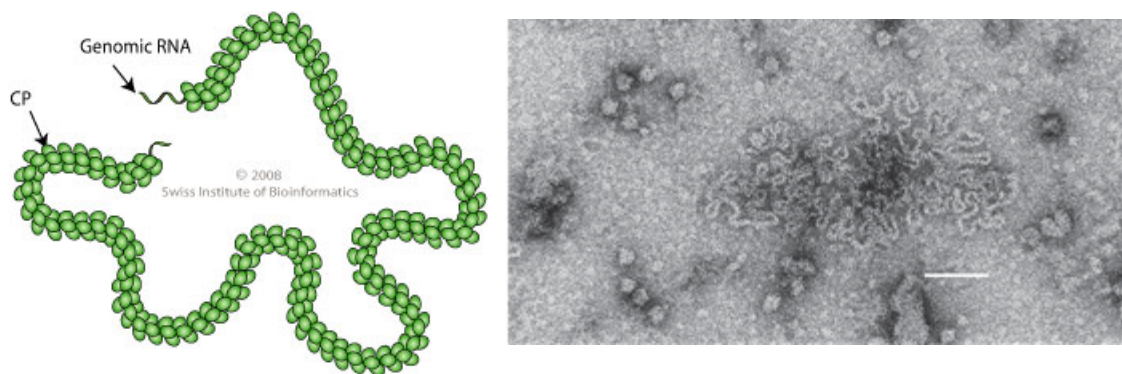
SDV infecta cítricos y otros miembros de la familia *Rutaceae*, incluida la especie *Poncirus trifoliata*, siendo las mandarinas las variedades más sensibles (Iwanami, 2010). A pesar que la enfermedad progresa lentamente, los árboles afectados presentan enanismo, hojas con forma de bote o cuchara y con entrenudos cortos, y la calidad y cantidad de fruta se ve drásticamente disminuída (Iwanami *et al.*, 2000; Iwanami, 2010).

El uso de material vegetal libre de virus es el mecanismo de control primario de este patógeno. Métodos de diagnóstico mediante caracterización biológica (*Sesamum indicum* L), serológico (DAS-ELISA) y molecular (RT-PCR), pueden utilizarse para la certificación de plantas madre libres de este patógeno; mientras que para la detección en campo se utiliza un test rápido basado en inmunocromatografía y la RT-PCR, que permite el análisis masivo de muestras (Iwanami, 2010).

### 1.2.3. Virus de la Psorosis de los Cítricos (*Citrus psorosis ophiovirus*, CPsV)

La Psorosis es una enfermedad ampliamente distribuida que causa daños severos en regiones cítricas de América del Norte, América del Sur y la Cuenca Mediterránea (Roistacher, 1993; EPPO 2022 <https://gd.eppo.int/taxon/CPSVoo/distribution>). Es una de las enfermedades virales más antiguas reportadas en los cítricos. Fue descrita y nombrada en 1896, en Florida (USA) por Swingle y Webber, aunque no fue hasta 1933 que Fawcett reconoce su etiología viral (Fawcett, 1933). En la década del 80 causó severos problemas en Argentina y Uruguay, produciendo pérdidas anuales de alrededor del 5% de los árboles, y continúa siendo un problema en la actualidad en plantaciones antiguas (Danos, 1990; Zaneck *et al.*, 2006, Belabess *et al.*, 2020; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2020).

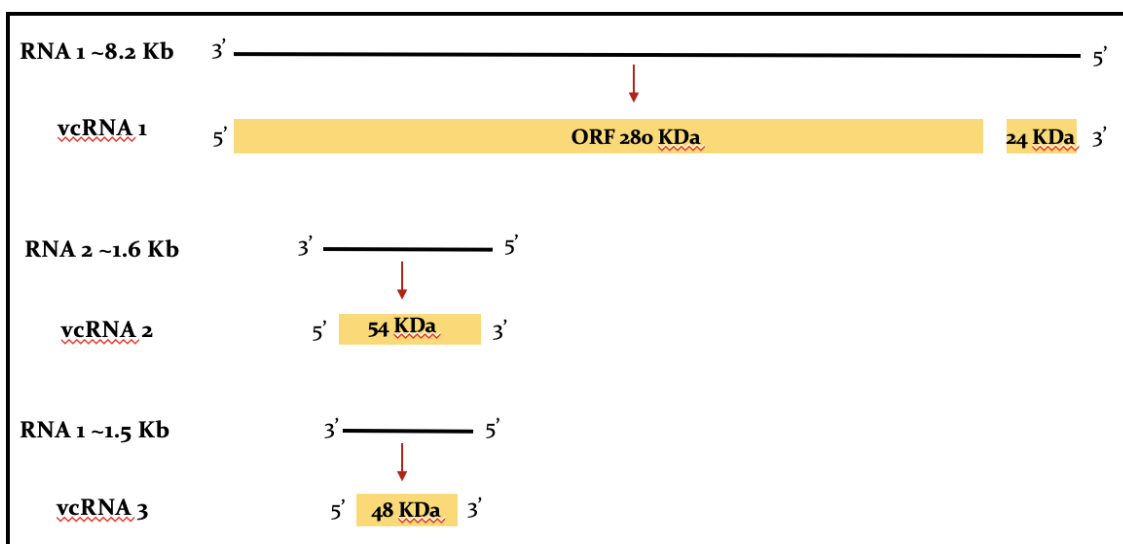
El agente causal de la enfermedad es el CPsV que es la especie tipo del género *Ophiovirus* dentro de la familia *Aspiviridae* (García *et al.*, 2017; ICTV 2020, <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>). Los viriones de CPsV son filamentos de 3-4 nm de diámetro y entre 700 y 2000 nm de largo, cuyo genoma está compuesto por tres moléculas de RNA simple hebra de polaridad negativa cubierto por la proteína de cápside (Figura 4) (García *et al.*, 1991; 2017; Navas-Castillo, 1995).



**Figura 4.** Esquema de la estructura de helicoidal del virión de CPsV (izquierda, tomado de ViralZone). Micrografía electrónica de contraste negativo de la forma abierta de partículas de CPsV (derecha). La barra representa 100 nm. (tomado de [https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_online\\_report/negative-sense-rna-viruses/w/aspiviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/w/aspiviridae)).

El RNA viral 1 tiene un tamaño de 8184 nt y su hebra complementaria (vcRNA) contiene dos ORFs que codifican para una proteína de 24 kDa, involucrada en el procesamiento de microRNAs y la supresión del silenciamiento por interferencia de

RNA, y para la RNA polimerasa RNA dependiente de 280 kDa (Naum-Ongania *et al.*, 2003; Belabess *et al.*, 2020). El RNA 2, de 1644 nt, codifica en su vcRNA una proteína de movimiento de 54 kDa involucrada en la expresión de síntomas y la supresión del silenciamiento por interferencia de RNA (Belabess *et al.*, 2020). Por último, la molécula de RNA viral 3 con una longitud de 1454 nt, codifica para la proteína de cápside (CP) de 48.6 kDa (Fig 5) (Barthe *et al.*, 1998; Sánchez de la Torre *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Representación gráfica de la organización del genoma tripartito de CPsV. Se muestran los tres segmentos genómicos con sus respectivas hebras complementarias y el tamaño del producto proteico que cada una codifica.

La enfermedad se propaga principalmente por material vegetal infectado, aunque varias observaciones sugieren la existencia de un vector, hasta el momento desconocido (Timmer & Garnsey, 1980; Beñatena & Portillo, 1984; Martín *et al.*, 2004). Psorosis puede afectar varias partes del árbol, incluyendo el tronco, ramas, hojas y frutos. Los síntomas característicos de la enfermedad en el campo incluyen la descamación del tronco y ramas principales con tinción de la madera en las áreas lesionadas (Roistacher, 1993; Moreno *et al.*, 2015). La descamación del tronco aparece usualmente en árboles de entre 12 a 15 años de edad, aunque se han observado árboles infectados de 20 años o más sin descamación de la corteza (Velázquez *et al.*, 2012). Este desfase en la expresión de síntomas favorece la propagación accidental de brotes infectados, que aparentan estar libres de Psorosis, por los productores. Aunque esta enfermedad rara vez mata a la planta, los árboles afectados muestran follaje fino, muerte de ramas jóvenes, retraso en el crecimiento, bajo rendimiento y producción de

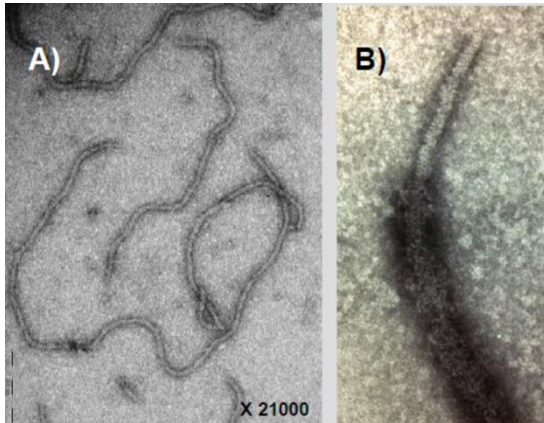
fruta pequeña, lo que afecta directamente su capacidad productiva (Velázquez *et al.*, 2012).

#### **1.2.4. Virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV)**

La enfermedad de los cítricos conocida comúnmente como "tristeza" es una de las enfermedades transmisibles por injerto y vectores más importante a nivel mundial. Al momento se encuentra catalogada, y desde su aparición hace dos siglos, como la enfermedad viral más destructiva y más estudiada en cítricos (Roistacher *et al.*, 2010). Esta enfermedad ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles injertados sobre naranjo amargo; y un importante debilitamiento y baja productividad de varios millones más en el mundo entero (Roistacher & Moreno, 1991; Moreno *et al.*, 2008). La capacidad de destrucción de CTV es tan grande, que entre 1940-50, logró matar más de 20 millones de árboles en el Sur de nuestro continente, es decir, en Brasil, Argentina y Uruguay (Rocha-Peña *et al.* 1995).

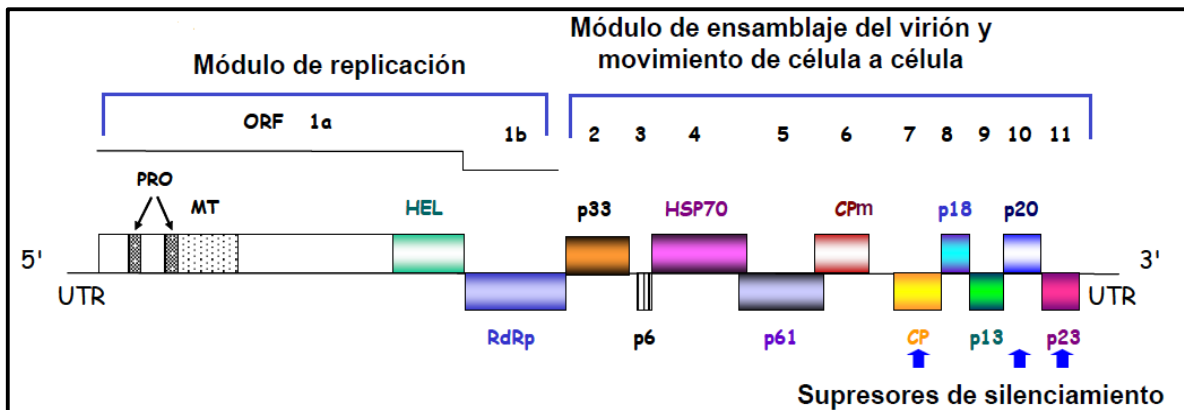
En la actualidad, CTV se encuentra distribuido en todas las zonas cítricas del mundo. Es endémico en Asia, África, Australia, América del Sur y gran parte de Centroamérica (<https://gd.eppo.int/taxon/CTVooo/distribution>). La dispersión de CTV a nuevas regiones ocurre principalmente por movimiento de plantas o por propagación de yemas infectadas. A nivel local, puede ser dispersado por varias especies de áfidos, siendo *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) la especie más eficiente (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Durán-Vila & Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000; Brlansky *et al.*, 2003). La transmisión a través de semillas no ha sido reportada (McClellan, 1957).

CTV es el virus de plantas más grande descrito hasta el momento. Pertenece al género *Closterovirus* dentro de la familia *Closteroviridae* (Bar-Joseph *et al.*, 1979; <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>, 2020). Como todos los miembros de esta familia, los viriones presentan una cápside de estructura helicoidal de morfología filamentosa (2000 x 11 nm), formada por dos proteínas de cápside, una de 25 kDa (p25, CP) que cubre aproximadamente el 95% de la longitud del virión, y otra de 27 kDa (p27, CPM) que cubre el 5% restante (Figura 6) (Ayllón *et al.*, 2001). No presenta envoltura derivada de la célula hospedera (Karasev *et al.*, 1995).



**Figura 6.** Micrografías electrónicas de viriones purificados de CTV. A. Tinción negativa con acetato de uranilo al 1%. B. Ausencia de reacción de anticuerpos anti-CP en el extremo 5' de la partícula viral. Tomado de Ruiz-Ruiz, 2009.

El genoma está formado por una molécula de RNA simple hebra de polaridad positiva, de 19.3Kb aproximadamente, que presenta doce ORFs y que codifican para diecisiete productos proteicos (Figura 7). En sus extremos 5' y 3' se encuentran dos regiones no traducidas (5' y 3' Untranslated Regions, UTR) de 107 y 273 nt, respectivamente (Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996).



**Figura 7.** Representación gráfica de la organización del genoma de CTV. Se muestran los ORF con sus respectivos productos proteicos, así como los dominios homólogos de metiltransferasa (MT), proteasa (PRO) y helicasa (HEL). Se indican también los extremos 5' y 3' no traducidos. Tomado de Ruiz-Ruiz, 2009.

El tipo e intensidad de los daños provocados por la tristeza en el campo depende de las especies infectadas, del portainjerto sobre el que están injertadas, del aislado de CTV y de las condiciones ambientales (Grant & Costa., 1951; Roistacher & Moreno., 1991; Roistacher *et al.*, 2010). Aunque existen aislados de CTV esencialmente asintomáticos, se ha descrito la existencia de sintomatología con distintos grados de severidad. La mayoría de los aislados pueden causar uno o más de los siguientes síndromes: i) necrosis de células del floema debajo de la unión injerto-portainjerto de plantas injertadas sobre naranjo amargo (Tristeza), ii) enanismo y acanaladuras en la madera de lima, pomelo o naranjo dulce ("*stem pitting*", SP) y iii) enanismo y amarillamiento de plantas de limonero, pomelo o naranjo amargo ("*seedling yellows*", SY).

La Tristeza causa declinamiento a diferentes especies de cítricos (*Citrus sinensis* (naranjo dulce), *C. reticulata* (mandarina), *C. paradisi* (pomelo) y *C. aurantifolia* (lima)) injertados sobre naranjo amargo (*C. aurantium*). CTV induce la muerte de los vasos conductores de savia, produciendo cantidades excesivas de floema no funcional en la unión injerto-pie, impidiendo el pasaje de metabolitos de la copa hacia las raíces de la planta, lo que resulta en la muerte del sistema radicular (Schneider, 1959). La expresión más dramática de la enfermedad es el declinamiento rápido, por el cual árboles de apariencia normal comienzan a mostrar síntomas de marchitamiento y colapsan completamente en pocas semanas. Los árboles afectados muestran un follaje amarillento con hojas cloróticas, caída de hojas, muerte regresiva de ramas y frutas pequeñas de colores pálidos con valor comercial nulo.

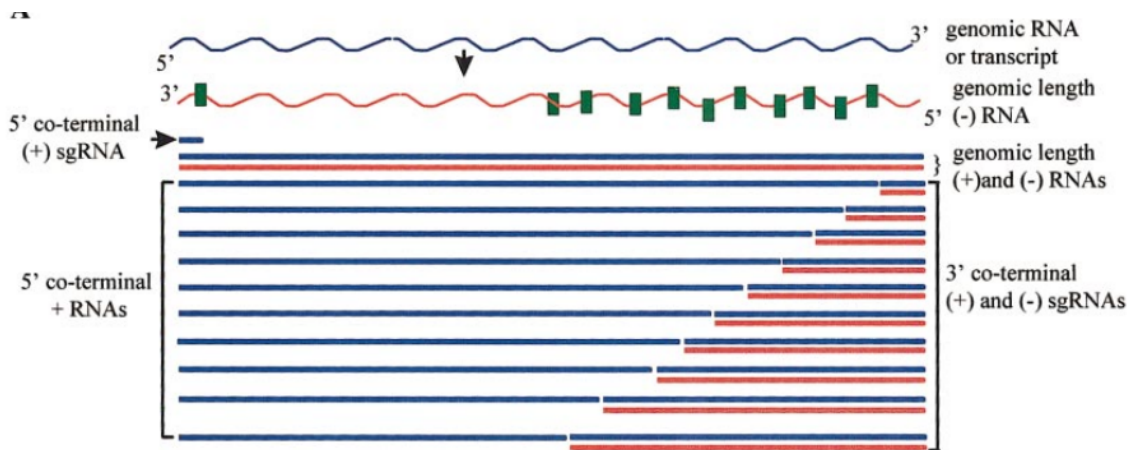
El síndrome llamado "Acanaladuras en la madera" o *Stem Pitting* (SP) afecta cultivares sensibles independientemente de la combinación variedad-portainjerto. La enfermedad se inicia por la interrupción de la actividad meristemática en áreas limitadas del cambium, lo que resulta en un crecimiento radial irregular con depresiones locales (Schneider; 1959). La formación de canales puede limitar el crecimiento radial del tallo y produce atrofia, follaje delgado con hojas cloróticas pequeñas, poca producción de frutos, muy pequeños y casi sin jugo, imposibles de comercializar. A diferencia de tristeza, el SP por lo general no causa la muerte del



árbol, sino que lo convierte en un árbol con permanentes limitaciones de producción provocando grandes pérdidas económicas (Moreno *et al.*, 2008).

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

En cuanto al genoma de CTV, la organización genómica es similar a la de los Coronavirus. Ambos grupos de virus codifican una gran poliproteína a partir de la mitad 5' del genoma, traducida directamente del RNA genómico, con la porción C terminal expresada mediante un mecanismo de *frameshifting* +1, que luego es procesada proteolíticamente. Por otro lado, los genes de la mitad 3' del genoma son expresados mediante la formación de RNAs subgenómicos (sgRNAs) que varían entre 0,9-8 kb (Karasev *et al.*, 1995). Las infecciones por CTV se caracterizan por la presencia de grandes cantidades de dsRNAs. Además del RNA genómico, las células infectadas contienen moléculas de la forma replicativa del virus (hebras positivas y negativas del largo del genoma), un gran número de sgRNAs de las mitades 5' y 3' del genoma, y cantidades variables de RNAs defectivos (Figura 8) (Gowda *et al.*, 2001; Bar-Joseph & Mawassi, 2013). Es así que CTV puede producir alrededor de 30 especies de RNAs en células infectadas (Gowda *et al.*, 2001).

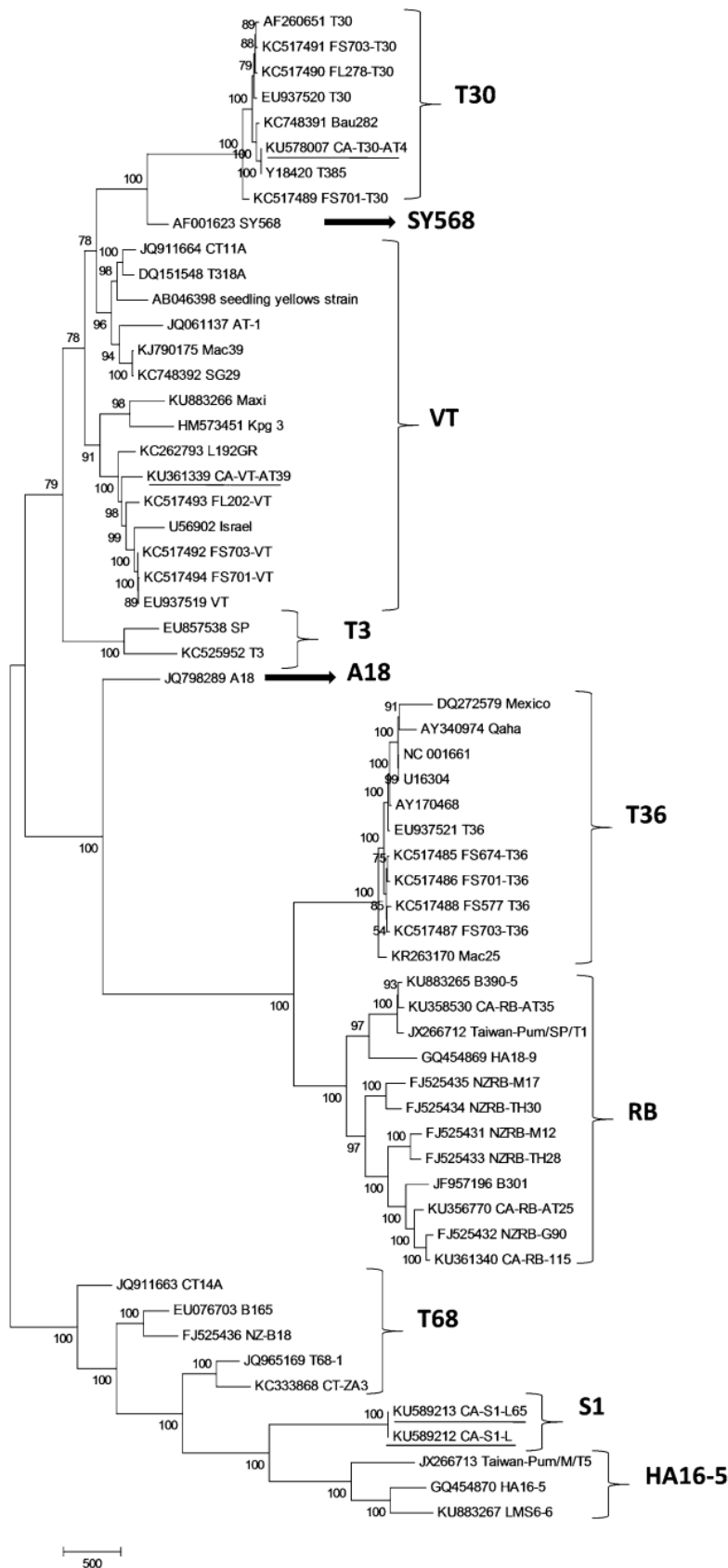


**Figura 8.** Modelo de las diferentes especies de RNAs producidos en células infectadas por CTV. Se muestran los RNAs positivos (azul) y negativos (rojo). Los recuadros verdes representan los elementos de control de los sgRNAs. Tomado de Gowda *et al.*, 2001.

Las poblaciones de CTV, que comprenden todas las cepas, genotipos y variantes de secuencia presentes en un único individuo, presentan dos niveles de complejidad. El primero está formado por los genotipos o cepas existentes. Al momento se han descrito al menos ocho genotipos mediante análisis filogenético de genomas completos (Figura 9) (Harper, 2013; Yokomi *et al.*, 2018). Debido a la exposición constante al vector en el campo, las mezclas de genotipos son una parte importante en la expresión de síntomas, ya que la presencia de más de un genotipo o cepa puede modificar la severidad de los síntomas o retrasar la aparición de los mismos. Además, la coexistencia de diferentes genotipos en un mismo individuo es fundamental para que ocurra uno de los mecanismos más importantes para la evolución de CTV, la recombinación (Weng *et al.*, 2007).

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

la separación de genotipos en las poblaciones de CTV (d'Urso *et al.*, 2000; Brlansky *et al.*, 2003; Sambade *et al.*, 2007; Roy & Brlansky, 2009).



**Figura 9.** Árbol filogenético de Máxima Parsimonia realizado con 60 genomas completos de CTV donde se observan los ocho genotipos descritos hasta el momento. Los apoyos de los nodos fueron realizados con 1000 réplicas de bootstrap. Tomado de Yokomi *et al.*, 2018.

## 1.1. Relevancia de la investigación

Se estima que las pérdidas económicas en el sector cítrico nacional causadas por los patógenos analizados en la presente tesis son muy importantes. A su vez, no existen datos respecto a la distribución e incidencia de dichas enfermedades en el país, lo cual consideramos de gran importancia para establecer planes de manejo adecuados en las distintas zonas cítricas del Uruguay. El principal método de detección utilizado actualmente para el diagnóstico y caracterización es el "testaje o caracterización biológica", que es costoso, consume mucho tiempo y no permite el análisis masivo de muestras, lo que limita su uso en estudios epidemiológicos. Diversos países realizaron en las últimas décadas estudios moleculares masivos de campo que permitieron caracterizar el grado de afectación de los cultivares cítricos por los mencionados patógenos y éstos han ayudado a disminuir la incidencia, mejorar el manejo y los niveles de producción (Zanek *et al.*, 2008; Ghazal *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2020).

A su vez, la existencia de variantes genéticas de CTV con diversos grados de severidad que coexisten en una misma planta formando complejas poblaciones virales con diferentes características biológicas, ha sido reportada en todas las áreas cítricas afectadas del mundo (Moreno *et al.*, 2008). Se ha descrito la PC como el método más efectivo de control viral en campo y actualmente se utiliza con éxito en países altamente competitivos a nivel mundial como Sudáfrica, Brasil, Australia, Perú y Japón (Roistacher *et al.*, 2010; Folimonova, 2013). Para que la PC funcione es necesario identificar en primer lugar los aislados severos que necesitan ser controlados, y luego encontrar aislados suaves del mismo genotipo para pre inmunizar las plantas, ya que la PC es genotipo específica (Folimonova, 2013). Estudios recientes, realizados por nuestro grupo, demostraron la presencia en nuestro país de aislados de tres genotipos previamente descritos, incluido el RB, y la circulación, con una alta incidencia del genotipo HA16-5 (Benítez-Galeano *et al.*, 2015, 2018, 2021; Rubio *et al.*, 2019; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2017, 2019).

Por lo previamente expuesto se justifica la necesidad de realizar estudios masivos de campo en Uruguay utilizando metodologías moleculares altamente sensibles, como PCR cualitativa y cuantitativa, a fin de determinar la incidencia y

distribución de los virus y viroides previamente mencionados que afectan las plantaciones cítricas del país. También se propone continuar con la caracterización molecular de CTV con el objetivo de conocer los distintos genotipos del virus que circulan en el país, y realizar la reconstrucción evolutiva del genotipo más prevalente mediante coalescencia y filogeografía.

Por otro lado, con el objetivo de conocer en profundidad subaislados homogéneos del genotipo más prevalente en el país, para ser utilizados en un plan de PC, nos propusimos aislar estirpes puras del virus para su caracterización. Para obtener los subaislados, se sometieron a cuellos de botella mediante la técnica de transmisión por un solo áfido (Single Aphid Transmission, SAT) subpoblaciones obtenidas de un aislado de campo. Se describieron biológicamente los síntomas que producen en plantas indicadoras y se obtuvo el genoma completo mediante secuenciación masiva. Esto nos permitirá no solo conocer en profundidad este nuevo aislado candidato para la PC, sino también aportar información relevante para la caracterización de este genotipo de CTV.

A partir de dicha información se pretende no solo caracterizar el genoma completo de los subaislados de CTV, como se mencionó previamente, sino también estudiar la estructura poblacional de los mismos, factor de vital importancia para conocer la patogénesis del virus, la cual varía de acuerdo a las variantes minoritarias presentes en la muestra, como se ha demostrado para los virus RNA. Estos resultados son necesarios a tener en cuenta al momento de evaluar la capacidad protectora de este genotipo tan representado en el país para ser utilizado en la PC.

## **1.2. HIPÓTESIS**

Las plantaciones de cítricos del Uruguay se encuentran infectadas por al menos un virus o viroide, con una alta prevalencia de CTV. Este virus se organiza en quasiespecies y puede encontrarse más de un genotipo infectando un único hospedero.

## **1.3. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el grado de afectación por virus y viroides en cultivares cítricos del Uruguay. Dada la elevada incidencia de CTV en el país se enfatizará en la caracterización molecular, evolutiva y biológica de 3 subaislados del virus de interés para la protección cruzada.

## **2. CAPÍTULO 1: DE VIRUS Y VIROIDES**

### **2.1. Objetivos específicos**

- 2.1.1. Optimizar la técnica de PCR en tiempo real con metodología SYBR® Green para la detección de CPsV utilizando la región de la cápside.
- 2.1.2. Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección de SDV.
- 2.1.3. Optimizar la técnica de RT-PCR para la detección del genoma completo de CEVd, HSVd, CDVd, CBCVd y CBLVd.
- 2.1.4. Analizar un total aproximado de 1200 muestras colectadas en diversas regiones citrícolas del país para los ocho patógenos mencionados.
- 2.1.5. Realizar análisis estadísticos sobre la incidencia y distribución de los distintos patógenos, resaltando las distintas zonas citrícolas del país y las variedades cítricas estudiadas.
- 2.1.6. Realizar estudios filogenéticos de CTV utilizando el gen p25 con el fin de conocer los genotipos circulantes.
- 2.1.7. Estudiar el comportamiento filodinámico de CTV en Uruguay.

## 2.2. **Benítez-Galeano *et al.* 2021\_First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay**

En el presente trabajo se realizó por primera vez a nivel país, un relevamiento de virus y viroides que afectan la citricultura del Uruguay. Se colectaron 1175 muestras distribuidas en 6 departamentos con producción citrícola relevante y también se tuvo en cuenta la especie y edad de la planta a la hora del muestreo. Se detectaron 5 de los 8 patógenos analizados, ya sea de manera individual o en co-infecciones de hasta 4 patógenos. CTV fue detectado en todas las muestras con al menos un patógeno y solo el 6% de las plantas se encontró libre de patógenos. También se analizó la variabilidad genética de los aislados de CTV circulantes en el país. El presente trabajo brinda información actualizada y de gran relevancia para la generación de políticas públicas y para los productores al momento de tomar decisiones sobre el manejo de este cultivo.

Con estos resultados se completaron los objetivos específicos 2.1.1., 2.1.2., 2.1.3., 2.1.4., 2.1.5. y 2.1.6.

Estos resultados fueron publicados en la revista *Journal of Citrus Pathology*: **Benítez-Galeano MJ**, Hernández-Rodríguez L, Dalmao F, Bertoni E, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Maeso C & Colina R. 2021. First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay. *J Citrus Pathol* 8(1). <https://doi.org/10.5070/C481049181>



## Research Article

## First comprehensive sanitary report of citrus viruses and viroids in Uruguay

M.J. Benítez-Galeano<sup>1,2\*</sup>, L. Hernández-Rodríguez<sup>3</sup>, F. Dalmao<sup>4</sup>; E. Bertoni<sup>3</sup>, A. Bertalmío<sup>3</sup>, L. Rubio<sup>3</sup>, F. Rivas<sup>3</sup>, D. Maeso<sup>3</sup>, R. Colina<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Virología Molecular, Rivera 1350, 50000, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay; <sup>2</sup>Unidad de Genómica y Bioinformática, Rivera 1350, 50000, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay; <sup>3</sup>Programa Nacional de Investigación en Producción Cítrica, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental Salto Grande, Camino al Terrible s/n, 50000, Salto, Uruguay; <sup>4</sup>Departamento de Matemática y Estadística del Litoral, 25 de Agosto 281, 50000, Universidad de la República, Salto, Uruguay.

\*Correspondence to: [mbenitezgaleano@gmail.com](mailto:mbenitezgaleano@gmail.com); [rodneycolina1@gmail.com](mailto:rodneycolina1@gmail.com)

**Citation:** Benítez-Galeano, MJ, Hernández-Rodríguez, L., Dalmao, F., Bertoni, E., Bertalmío, A., Rubio, L., et al. (2021). First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay. *Journal of Citrus Pathology*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.5070/C481049181> Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/74b8v3p2>

### Abstract

Citrus is the highest-value fruit crop in terms of international trade. However, citrus species are susceptible to several diseases caused by different pathogens which directly cause a decrease in production leading to economic losses. In the last half-century, the citrus industry in Uruguay has had a strong socio-economic impact and is also constantly evolving to stay competitive in world markets, by introduction of new varieties and improvement of production practices to obtain high yielding orchards. Nevertheless, despite the existence since 2014 of the Uruguayan National Citrus Sanitary and Certification Program, scarce information is available regarding the virus and viroid status of commercial citrus in Uruguay. The incidence of citrus tristeza virus (CTV), citrus psorosis virus (CPsV), satsuma dwarf virus (SDV), citrus exocortis viroid (CEVd), hop stunt viroid (HSVd), citrus dwarfing viroid (CDVd), citrus bark cracking viroid (CBCVd) and citrus bent leaf viroid (CBLVd) was investigated in this study, as well as CTV genotypes prevalent in the country. Molecular diagnostic assays were used to test 1175 samples including Valencia and Navel sweet oranges, Mandarin hybrids, Clementines and lemons, which were randomly collected from seven citrus-producing provinces. Only 6% of the samples were negative for the pathogens screened, while 93% of them were CTV positive. SDV, CBLVd and CBCVd were not detected. Co-infections were frequently detected, finding plants with up to four simultaneous pathogens, including CTV in all co-infected plants. This is the first comprehensive survey of several citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay, as well as a determination of the CTV genotypes prevalent in the country.

**Keywords:** Citrus viruses, citrus viroids, CTV genotypes, survey, Uruguay, molecular detection

### Introduction

Citrus is one of the most important fruit crops worldwide, but it is susceptible to several insect-borne and graft-transmissible pathogens and efficient disease management is required for competitive and sustainable production (Tennant et al. 2009; Donkersley et al. 2018; Spreen et al. 2020). Citrus growers worldwide are constantly challenged to introduce new varieties to increase competitiveness in export markets. One of the main approaches to replace old varieties with new ones in established commercial fields is by means of top-working (Albrecht et al. 2017). Although this practice shortens the production period compared to planting a new orchard, it should only be applied on healthy trees for long-term sustainability of the orchard (Sanderson et al. 2007). Thus, it is crucial to monitor the sanitary status of the crop as well as the certification of planting material regarding

different pathogens (Lee 2015). Besides, with the threat of the global citrus industry facing Huanglongbing (HLB), a clear picture of the disease status of a country is extremely important to reinforce good management practices of the crop, especially in countries that still remain HLB-free (da Graça et al. 2016; Gabriel et al. 2020).

In Uruguay, citrus has become one of the main non-traditional export commodities after rice and dairy, generating foreign exchange earnings of about 80 million dollars per year. In the last five years, citrus production has been on average around 242 thousand tons annually, half of which is exported to fresh fruit markets and the remainder is consumed by the domestic market or sent for processing (DIEA 2019, 2020). Citrus producing areas covered around 14700 hectares with 7.2 million trees, 82% of which are productive (DIEA 2020). Produced citrus types include 40.5% oranges, 36% mandarins,

23.2% lemons and 0.3% grapefruits (DIEA 2020). There are two main production regions in the country. The northern region, that includes Artigas, Salto, Paysandú and Río Negro provinces, mainly produces mandarins and oranges which accounts for 88% of total citrus production of the country. Canelones, Colonia, San José and Montevideo provinces belong to the southern citrus region, which mainly produces lemons (DIEA 2019). There are approximately 400 citrus farms, however, 75% of the production originates from a few large sized farms (DIEA 2019).

*Citrus* spp. are vulnerable to infection by several economically important citrus-infecting viruses and viroids that affect tree health and impact production. Pathogens of citrus include CTV (*Closteroviridae*, *Closterovirus*), CPsV (*Aspiviridae*, *Ophiovirus*), SDV (*Secoviridae*, *Sadwavirus*), as well as viroids of the *Pospiviroidae* family: HSVd (*Hostuviroid*), CEVd (*Pospiviroid*), CBCVd (*Cocadviroid*), CBLVd (*Apscaviroid*) and CDVd (*Apscaviroid*) (Zhou et al. 2020). CTV is the causal agent of the most important viral disease of citrus namely tristeza disease and has been reported in all citrus producing areas worldwide (Moreno et al. 2008; EPPO 2019). The virus is responsible for three different syndromes affecting citrus including: tristeza or quick-decline, seedling yellows and stem pitting (Moreno et al. 2008; Roistacher et al. 2010). Disease expression depends on both CTV strains present, and the scion-rootstock combination (Harper et al. 2015). Currently, eight strains have been characterised (Harper 2013, Yokomi et al., 2018). CPsV is the causal agent of psorosis disease and symptoms include bark-scaling of the trunk and main branches (García 2012). The disease was reported from many citrus growing areas of the world (Roistacher 1993). Satsuma dwarf disease, caused by SDV, was reported in Turkey, Iran, China, Japan, and North and South Korea (EPPO 2019). Trees affected by SDV become stunted, develop boat-, or spoon-shaped leaves, and fruit quality and yield are reduced (Iwanami 2010). Viroid-infected citrus, grafted onto sensitive rootstocks such as trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) or the citranges (*Citrus sinensis* (L.) Osb x *P. trifoliata*), show symptoms of bark cracking, scaling, stunting and yield loss depending on the viroid (Bani-Hashemian et al. 2009). HSVd, CEVd, CBLVd, and CDVd are distributed worldwide, whereas CBCVd has a seemingly limited distribution (Singh et al. 2003; Malfitano et al. 2005; Murcia et al. 2009; Cao et al. 2010; Cook et al. 2012).

The presence of some of these graft-transmissible pathogens was previously reported in Uruguay and CTV and its most efficient vector, *Toxoptera citricida* Kirkaldí, were shown to be endemic (Koch de Brotos and Boasso, 1955). More recent studies reported the molecular and biological characterization of CTV field isolates and described the circulation of VT, T3, T36, RB and HA16-5 CTV genotypes in the country either as single or mixed infections (Benítez-Galeano et al. 2015; 2018; Hernández-Rodríguez et al. 2017; Rubio et al. 2019).

CTV, CPsV and CEVd were reported in Salto province based on field symptoms (Tucci et al. 1965) and the presence of HSVd, CDVd, CEVd and CBLVd were reported for the first time 20 years ago (Pagliano et al. 1998). A recent analysis describes the presence and distribution of HSVd, CDVd, CEVd and CBLVd at rates of 92%, 50%, 23% and 21%, respectively (Pagliano et al. 2013). Contaminated graft and rootstock material leads to both quality and quantity decrease, as well as longevity, estimating losses of 30% of the national production (Bertalmio et al. 2012). The National Citrus Sanitary and Certification Program (PNSCC, by its acronym in Spanish) provides certified budwood and rootstocks to growers, free of pathogens such as CTV, CPsV, HSVd and CEVd. Since 2014, the use of certified material by the PNSCC has been mandatory (Bertalmio et al. 2012).

Despite the limited size of the citrus production-areas of Uruguay, the current diversity and distribution of virus and viroids affecting citrus is uncertain. In the present study the distribution and incidence of CTV, CPsV, SDV, CEVd, HSVd, CBLVd, CBCVd and CDVd, as well as the main CTV genotypes prevalent in the country, were investigated to contribute to an integrated pathogen management strategy development.

## Materials and Methods

### Sampling design

For sampling design the number of productive trees per geographic region and citrus type were taken into account based on an official citrus survey strategy of the Ministry of Livestock, Agriculture and Fisheries. We implemented a stratified sampling scheme with proportionate allocation being the strata defined to consider all possible combinations of citrus type and provinces. Thus, the sample size associated with each stratum was defined by  $n_i = n \cdot N_i / N$ , where  $n$  is the total sample size,  $N_i$  is the number of productive trees in the stratum  $i$  and  $N$  is the number of productive trees in the country. Concerning oranges and mandarins, productive trees are strongly grouped in Salto and Paysandú provinces. Productive lemon trees are highly grouped in San José province.

To be able to extrapolate results to the rest of the country, the number of collected samples was calculated based on a 95% confidence interval and an error tolerance up to 3%. Samples were collected from commercial groves over 26 months, from November 2014 to December 2016, with a simple random sampling method. A total of 1175 samples were collected across seven of the 19 provinces of Uruguay, including Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, San José, Montevideo and Canelones (Figure 1).

The geographic location (geo-referenced coordinates) of every sample was recorded. Sampling sites, as well as the number of samples collected in each province, were selected based on production volume, plant age and citrus variety. Four tree age categories were defined; group 1, trees up to 5 years old; group 2, 6 to 14 years; group 3, 15 to 25 years; and group 4, trees older than 25 years.

to 20 years; and group 4, trees over 20 years old. Citrus types sampled included sweet oranges (*Citrus sinensis*), both Valencia and Navels, Mandarin hybrids (*Citrus reticulata* Blanco), Clementines (*Citrus clementina* Hort. Ex tan.) and lemons (*Citrus limon* (L.) Burm. f.). Only the

Afourer cultivar was sampled for the mandarin hybrid group. All samples were grafted onto *P. trifoliata* rootstocks. A summary of total collected samples per geographic region, citrus variety and plant age is shown in table 1.

**Table 1**

Number of samples per citrus type collected from November 2014 to December 2016 listed per geographic region and plant age. The total number of samples collected at each province is in brackets.

		Citrus varieties					
		Valencia	Navel	Clementine	Mandarin hybrid	Lemon	
Geographic region	North	Artigas (n=15)	5	0	8	0	2
		Salto (n=509)	219	133	55	82	20
		Paysandú (n=450)	117	120	104	97	12
		Rio Negro (n=26)	7	5	8	6	0
	South	San José (n=61)	0	0	8	32	21
		Montevideo (n=32)	0	0	0	10	22
		Canelones (n=82)	0	0	0	7	75
Plant age*	Group 1 (n=194)	53	36	21	47	37	
	Group 2 (n=327)	82	67	37	128	13	
	Group 3 (n=251)	64	54	66	54	13	
	Group 4 (n=399)	148	100	59	4	88	

\*Four samples were not assigned to any age group.

#### Isolation of total RNA and RT-PCR

Leaf tissue was taken from 5 different sites of the canopy of each tree and pooled as one sample. Total RNA was extracted using the RNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. As all the targeted pathogens have an RNA genome, first-strand cDNA synthesis was performed with random primers and the RevertAid first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific Inc., Hanover, MD, USA) according to manufacturer's instructions (Supplementary materials for details). Detection of viruses and viroids was performed using previously published conventional and real-time PCR assays (Supplementary file for details). For detection of SDV, and viroids CEVd, HSVd, CBLVd, CDVd and CBCVd conventional PCR was used (Bernad and Durán-Vila 2006; Iwanami 2010). A real time PCR assay with SensiFAST™ SYBR® No-ROX kit (Meridian Bioscience, USA) was used for CPsV detection (De Francesco et al. 2015). For CTV detection, a real-time PCR with a hydrolysis probe as described by Bertolini et al. (2008) was used. For CTV characterization, a conventional PCR targeting p25 gene was used (Iglesias et al. 2008).

#### CTV characterization

For CTV genotypes determination circulating in the country, a total of 451 CTV positive samples were bi-directionally Sanger sequenced (Macrogen, Seoul, South Korea). CTV sequences of 555 nucleotides in length encompassing the p25 gene were aligned with ClustalW in MEGA 6.0 (Tamura et al. 2011). The model of nucleotide substitution that best fit the dataset (HKY) was selected using the jModelTest program according to the Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1974; Posada 2008). Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed with PhyML program using an online web server (Guindon and Gascuel 2003; Guindon et al. 2010). The heuristic tree search was performed using the SPR branch-swapping algorithm and branch support was calculated with the approximate likelihood-ratio (aLRT) SH-like test (Anisimova and Gascuel 2006). Complete genome sequences were retrieved from GenBank for reference sequences of eight CTV genotypes (T36: AY340974, U16304; T30: AF260651, Y18420; T3: KC525952; VT: EU857538, EU937519, U56902; T68: EU076703, JQ965169; RB: FJ525431, FJ525434; HA16-5: GQ454870; S1: KU589212, KU589213). Uruguayan sequences generated

were deposited in Genbank database with the following accession numbers: KX257284-KX257350, MN721464 - MN721811.

### Statistical analysis

In order to compare infected trees rate according to pathogen, geographic region, citrus type or plant age, a multiple hypothesis testing was performed considering Holm-Bonferroni method (Holm, 1979). Since Bonferroni's bound for family-wise error is quite conservative, p-values up to  $4e-3$  were considered to declare significance. R software version 3.3.3 (<https://www.r-project.org>) and the proportion test (`prop.test()`) which approximates the binomial distribution by the normal for large samples, were used for statistical calculations.

### Results

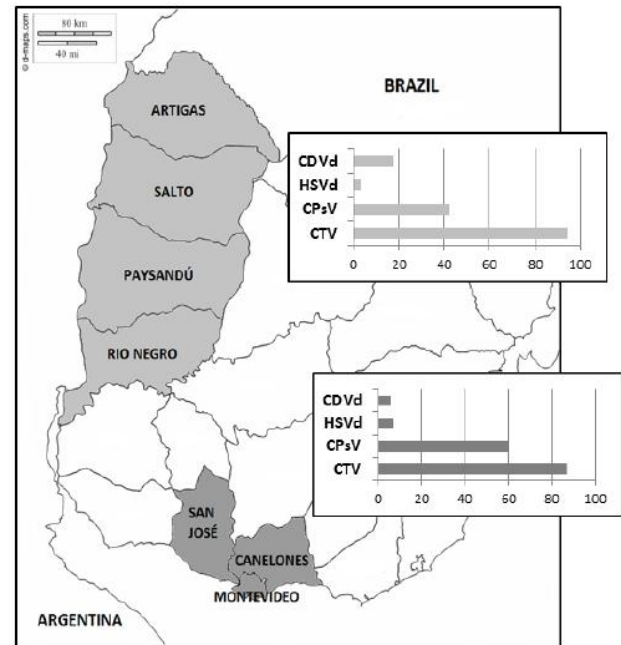
In the present study 1175 samples collected in the main Uruguayan citrus growing areas were analysed for the presence of eight graft-transmissible citrus pathogens. CTV was the most frequently detected virus. It was detected in 1096 samples corresponding to 93.3% prevalence. CPsV was identified in 529 samples, with a detection rate of 45%. HSVd and CDVd were less prevalent, with detection rates of 3.6% and 15.6% respectively. SDV, CBLVd and CBCVd were not detected, whereas CEVd was detected only in one sample. No pathogens were detected in 6% of all collected samples and less pathogen-free plants were detected, the older the trees were.

### Pathogen prevalence by geographic region

The two main citrus growing regions of Uruguay differ in citrus types planted, soil composition and climatic conditions. Due to these regional differences samples were representatively collected as per the sampling strategy and 1000 samples were collected from the north and 175 from the south. The prevalence of CTV, CPsV and CDVd differed between the northern and southern regions. The prevalence of CTV was significantly higher in the northern region at 94.4% (p-value:  $4.4e-4$ ) compared to 89.6% in the samples collected from the southern region. The presence of CDVd was also higher in the north, at 17.3% compared to 5.7% in the south (p-value:  $1.5e-4$ ). Conversely, the prevalence of CPsV was significantly higher in the southern region, with a detection rate of 60% compared to a prevalence of 42.4% (p-value:  $2.3e-5$ ) in the north. HSVd was detected at similar rates in the two regions, with no significant differences. In the northern region 3% of the samples were positive for HSVd, whereas in the south a prevalence of 6.9% was determined. Figure 1 is a graphic representation of the detection of each pathogen per region.

CTV and CDVd were significantly less prevalent in San José province compared to the other six provinces (p-values:  $4.8e-8$  and  $4.0e-3$ , respectively). CTV was

detected in 75% of samples in San José and in other provinces detection ranged between 91% and 100% (Table 2). CDVd



**Fig. 1.** Percentage of positive samples for the analysed pathogens in the northern (light grey) and southern (dark grey) regions of the country.

was detected in 2% of samples collected from San José whilst in the rest of the country detection ranged between 6% and 24% (Table 2). The detection of CPsV and HSVd was lower in San José compared to the other provinces but this difference was not statistically significant.

### Pathogen prevalence per citrus type

Differences in pathogen prevalence between citrus types were analysed and results are presented in Table 2. CTV was significantly more prevalent (97%) in sweet oranges compared to mandarins (p-value:  $9.3e-11$ ) and lemons (p-value:  $1.7e-3$ ). Despite relatively high detection rates of CTV in mandarins and lemons (over 85%), no statistically significant differences were found between these citrus types. Conversely, CPsV was more frequently detected in lemons compared to sweet oranges with detection in 74% of samples (p-value:  $1.1e-8$ ). The detection of CPsV in sweet oranges was higher than in mandarins (p-value:  $3.2e-7$ ). Between the mandarin types, Clementines and Mandarin hybrids (Afourer), the detection of CPsV was significantly lower in the latter at 23% (p-value:  $8.5e-5$ ). HSVd was not detected in Afourer and only in a single Navel orange sample. The detection rates for HSVd in the various citrus types ranged from 0% to 11%. CDVd was more prevalent than HSVd in all the citrus types ranging between 11% and 21%. Nevertheless, no significant differences were found for CDVd between citrus types.

Overall, pathogen detection was lowest in Afourer (mandarin hybrid) at 85% for CTV, 23% for CPsV, 11% for CDVd and no detection of HSVd.

**Table 2**

Numbers and percentages of positive samples for CTV, CPsV, HSVd and CDVd per geographic region, citrus type and plant age. Red squares highlight statistically significant results.

		Collected samples	CTV		CPsV		HSVd		CDVd	
			Total	%	Total	%	Total	%	Total	%
Geographic region	Artigas	15	15	100	8	53	0	0	0	0
	Salto	509	478	94	211	41	12	2	61	12
	Paysandú	450	426	95	185	41	13	3	107	24
	Río Negro	26	25	96	20	77	5	19	5	19
	San José	61	46	75	23	38	1	2	1	2
	Montevideo	32	31	97	24	75	4	13	4	13
	Canelones	82	75	91	58	71	7	9	5	6
Citrus varieties	Valencia	348	343	99	177	51	7	2	51	15
	Navel	258	249	97	110	43	1	0	54	21
	Clementine	183	165	90	76	42	17	9	37	20
	Afourer	234	199	85	54	23	0	0	25	11
	Lemon	152	140	92	112	74	17	11	16	11
Plant age (years)	Group 1 (up to 5)	194	168	87	92	47	4	2	28	14
	Group 2 (6 to 14)	327	303	93	88	27	3	1	52	16
	Group 3 (15 to 20)	251	239	95	92	37	6	2	41	16
	Group 4 (over 20)	399	385	96	257	64	29	7	62	16

#### Pathogen prevalence and tree age

The influence of tree age on pathogen prevalence was investigated. No significant differences were found among age groups 1 to 3 for any of the pathogens. However, trees older than 20 years had higher rates of CTV (p-value: 4.0e-3), CPsV (p-value: 2.2e-16) and HSVd (p-value: 2.5e-6).

#### Prevalence of pathogen co-infections

Co-infection of pathogens was frequent. Fifty-one percent of the samples were co-infected with at least two pathogens (597 co-infected trees). Forty percent of samples were infected with two pathogens (463 samples) and the most common pathogen combination was CTV and CPsV (84%). Ten percent of samples were co-infected with three pathogens (120 samples) and the most frequent trio was CTV, CPsV and CDVd (80%). Fourteen samples were co-infected with the four pathogens (CTV, CPsV, CDVd and HSVd). The only sample infected with CEVd, a lemon tree from Salto

province, additionally contained CTV, CPsV and HSVd. CTV was present in all co-infected plants. No co-infections of CDVd and HSVd or in combination with CPsV were detected.

More co-infected trees were detected in the northern region compared to the southern region (p-value: 1.7e-3). More pathogen combinations were found in the northern region, e.g. Clementines from Paysandú province had seven different pathogens combinations and lemons from Salto province were infected with six different pathogens combinations (data not shown). Pathogen combinations detected in the south were less complex with only four pathogen combinations (data not shown).

Regarding citrus types, lemons had the highest frequency of co-infections (p-value: 5.5e-5) and mandarins had significantly less co-infections than sweet oranges (p-value: 1.8e-9).

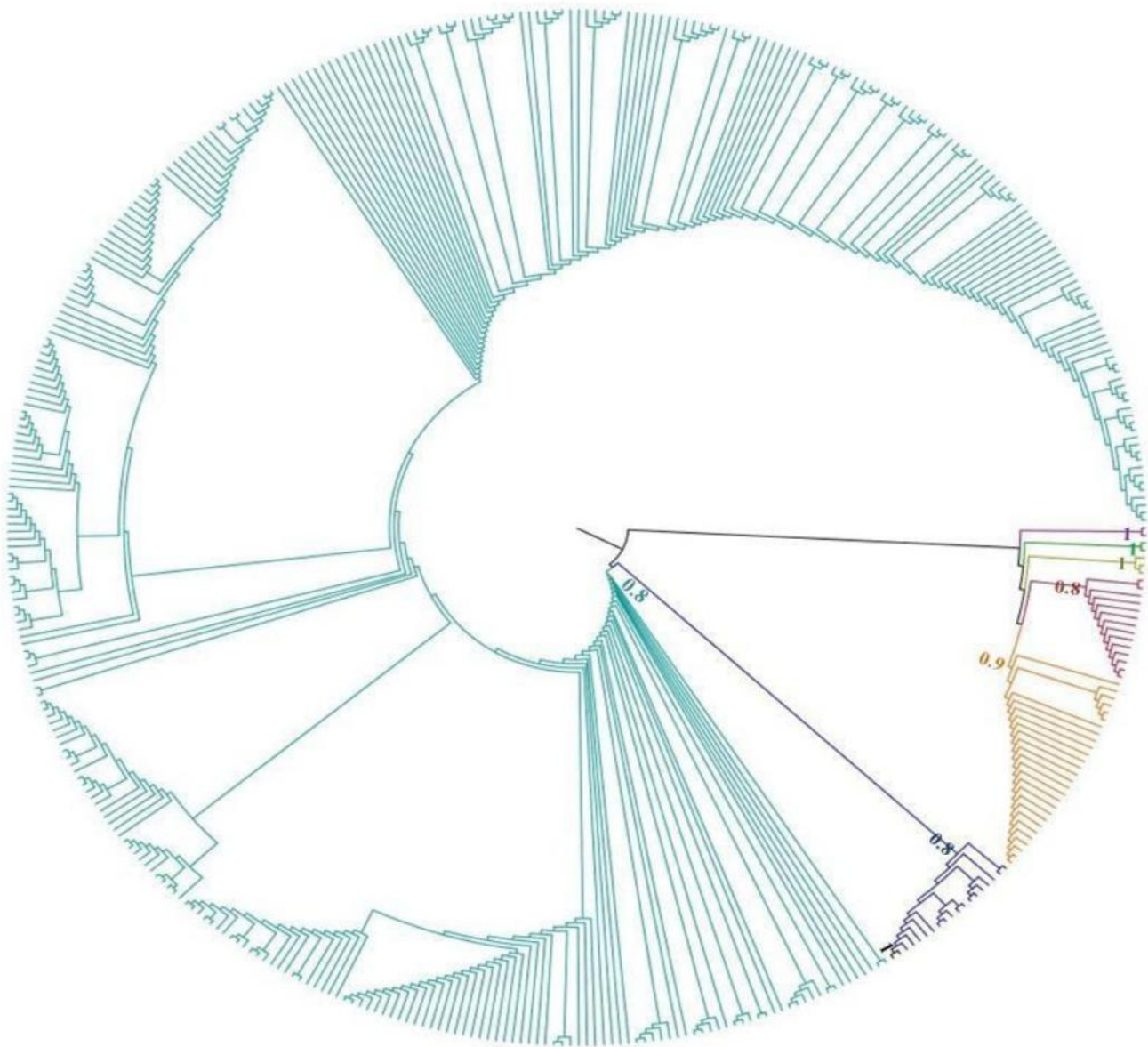
### CTV genotype prevalence

A maximum likelihood phylogenetic tree was constructed with 416 nucleotide sequences of the p25 gene region to determine the prevalence of CTV genotypes. Five genotypes were identified and 87% of the samples grouped into the HA16-5-genotype with an aLRT support of 0.8 (Figure 2).

Twenty-six samples (6.3%) clustered with T68 of which 19 were Afourer samples. Genotypes RB and VT were detected in 3.6% and 2.6% of the analysed samples, respectively. The RB genotype was detected in all the citrus types, but VT was only detected in lemons. Two sequences clustered with T3 genotype. The S1, T30 and T36 genotypes were not detected in any of the samples.

No statistically significant differences were found between the RB, T3 and VT genotypes in plants of different age groups.

However, genotype T68 was significantly more prevalent in plants of age group 2 (p-value:  $7.8e-12$ ), whereas genotype HA16-5 was significantly more prevalent in plants older than 20 years old (p-value: 0.0001). The HA16-5 genotype was more prevalent in sweet oranges compared to other citrus types (p-value:  $1.1e-9$ ), but was significantly less in the Afourer cultivar (p-value:  $2.2e-16$ ).



**Fig. 2.** Cladogram of CTV-p25-gene sequences. Coloured branches represent the seven described genotypes of the virus (T30, green; T36, violet; T3, yellow; VT, red; T68, orange; RB, blue; S1, black; HA16-5, turquoise). Principal nodes' aLRT support values are given.

## Discussion

The aim of this study was to determine the sanitary status of citrus orchards in Uruguay for specific graft-transmissible viruses and viroids. The occurrence and distribution of eight viral and viroid pathogens, as well as the main CTV genotypes prevalent in Uruguayan citrus were determined. Despite regional surveys reporting the presence of CTV, CPsV and citrus viroids including HSVd, CEVd, CDVd and CBLVd, a national survey was not previously conducted (Tucci et al. 1965; Pagliano et al. 1998; 2013). SDV, CBLVd and CBCVd were not detected and CEVd was not widely detected in this study whilst CTV, CPsV, HSVd and CDVd were found widespread in Uruguay.

CTV was the most prevalent virus detected and was present in all the regions sampled and in all citrus types. CTV was however more prevalent in the north of the country in sweet oranges, which is the main citrus type produced in the region. Also, CTV was more prevalent in trees older than 20 years, probably due to the longer exposure to the CTV vector, *T. citricida*. Previous studies reported the presence of CTV in Uruguay, and various CTV genotypes, including the RB genotype, which was found on trifoliolate rootstocks previously thought to be CTV resistant (Garnsey et al. 1987; Benítez-Galeano et al. 2015, 2018; Hernández-Rodríguez et al. 2017, 2019; Rubio et al. 2019). Results also confirmed the previously reported, widespread distribution of the HA16-5 genotype in all the citrus growing regions of the country (Benítez-Galeano et al. 2015, 2017; Rubio et al. 2019).

This multi-causal scenario is a product of biological characteristics of the virus and management strategies. The endemic distribution of CTV in Uruguay can be attributed to the presence of the most efficient vector of CTV and the existence of older orchards which acquired CTV over time. The PNSCC stated in 2014 the compulsory use of certified budwood and rootstocks, but the benefits of the sanitary scheme were not observed in older orchards established prior to the scheme. These results support the long-term goals of the National Research Program for Citrus Production for implementing cross protection for CTV management, previously demonstrated to minimize damage by CTV severe strains in Brazil and South Africa (Roistacher et al. 2010). However, the implementation of cross-protection could be challenging due to the diversity and population complexity of CTV strains found in the country (Benítez-Galeano et al. 2015, 2017; Hernández-Rodríguez et al., 2019; Rubio et al. 2019). As cross-protection is genotype specific, it would be reasonable to implement cross-protection for HA16-5 genotype due to its widespread distribution, as well as for RB genotype since 90% of Uruguayan citrus trees are grafted onto trifoliolate rootstocks (Folimonova 2013; Bergua et al. 2016).

After the destruction of citrus groves by tristeza in Uruguay in the 1940s, an increased incidence and disease

severity of psorosis was reported (Tucci et al. 1965). This spread of CPsV could be explained by an indiscriminate use of diseased budwood (Tucci et al. 1965). Natural spread of the virus has also been suggested in Uruguay, Argentina and in Texas, USA, but no vector has been found yet (Campiglia et al. 1976; Pujol and Beñatena 1965; Timmer and Gamsey 1980; Garcia et al. 2017; Hernandez-Rodriguez et al. 2020; Zhou et al. 2020). CPsV was the second most prevalent pathogen detected in this study and was also present in all regions sampled. This is the first quantitative survey for CPsV which detected the virus in 45% of the samples. This result, in combination with the high CTV and CPsV co-infection rate, could suggest the presence of a common vector for both viruses. Despite Hernández-Rodríguez et al. (2020) could not find evidence of CPsV transmission by *T. citricida*, further experiments with other aphid species are necessary to test this hypothesis.

Although the limited distribution of SDV around the world, SDV infects nearly all of the citrus and citrus relatives and the most sensitive citrus type is mandarin (Iwanami 2010). The introduction of infected material to Uruguay is possible due to commercial relationships with countries that have reported the presence of the virus. SDV was included in the present study since spoon-shaped leaves were observed in Uruguayan citrus groves and 36% of the citrus planted are mandarins. The virus was not detected, suggesting that the observed symptoms could have been due to physiological effects, such as thermal shock.

Pagliano et al. (2013) reported the occurrence and distribution of HSVd, CDVd, CEVd and CBLVd with detection rates of 92%, 50%, 23% and 21%, respectively. Results of this study however, showed lower incidences of HSVd, CDVd and CEVd and no detection of CBLVd. Viroids are transmitted by infecting budwood and contaminated tools. Appropriate management strategies such as removal of symptomatic plants and tool disinfection, as well as the use of certified plant material over time could explain the low detection of these pathogens.

A focus of the National Research Program for Citrus Production to gain greater access to international citrus markets by varietal replacement has led to the planting of new orchards such as was done for Afourer since 2007. The use of imported certified plant material at that time could explain the lower prevalence of CTV, CPsV and CDVd and the lack of detection of HSVd in this cultivar. Younger orchards also have a shorter exposure time for CTV infection to have occurred.

The widespread distribution of CTV and its vector *T. citricida*, changes on rootstocks usage over time, the lack of knowledge about the sanitary condition of plants used as bud sources, and the absence of a plant material sanitation and certification program set the perfect scenario for dissemination of citrus virus and viroids. Therefore, co-infections of viruses and viroids were found more frequently in older orchards. However, the implementation of the PNSCC has seemingly led to a

decrease in the incidence of citrus viruses and viroids. The prevalence of HSVd, CEVd and CDVd was shown to be lower than previously reported and CBLVd was not detected again. Additionally, this study is informative for growers and they should be encouraged to test for graft-transmissible pathogens prior to top-working older orchards to new varieties.

Besides, the information gathered here about CTV genotypes circulating in the country is extremely important to support the national efforts to develop cross-protection to manage the virus.

### Acknowledgments

The authors would like to thank Mr. Juan Amaral for the help collecting the samples. The funding for this research was from the National Institute of Agricultural Research, project INIA FPTA-310. During the execution of this work MJB-G was recipient of a PhD fellowship from the Academic Postgraduate Commission, Universidad de la República-Uruguay.

### References

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control.* 19:716–723.
- Albrecht U, Zekri M & Williamson J. 2017. Citrus Propagation. University of Florida IFAS Extension (<http://edis.ifas.ufl.edu>), publication HS1309.
- Anisimova M & Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55:539–552.
- Bani-Hashemian SM, Serra P, Barbosa CJ, Juárez J, Aleza P, Corvera JM, Lluch A, Pina JA & Durán-Vila N. 2009. Effect of a field-source mixture of citrus viroids on the performance of ‘Nules’ Clementine and ‘Navelina’ sweet orange trees grafted on Carrizo Citrange. *Plant Disease.* 93: 699-707.
- Benítez-Galeano MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G & Colina R. 2018. Complete genome sequence of a novel recombinant citrus tristeza virus, a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announcements* 6:e00442–e00418.
- Benítez-Galeano MJ, Castells M & Colina R. 2017. The Evolutionary History and Spatiotemporal Dynamics of the NC Lineage of Citrus Tristeza Virus. *Viruses.* 9:272; doi:10.3390/v9100272
- Benítez-Galeano MJ, 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.
- Bergua M, Kang SH & Folimonova SY. 2016. Understanding superinfection exclusion by complex populations of Citrus tristeza virus. *Virology,* 499, 331-339.
- Bernad L & Durán-Vila N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes.* 20:105-113.
- Bertalmío A, Maeso D, Sanguinetti G, Fontán G, De los Santos M, Borde J, Montes F, Colina R & Rivas F. 2012. Saneamiento y certificación de cítricos. *Revista de INIA Fruticultura,* 49-53.
- Bertolini E, Moreno A, Capote N, Olmos A, de Luis A, Vidal E, Pérez-Panadés J & Cambra M. 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathology.* 120:177–188 DOI 10.1007/s10658-007-9206-9.
- Campiglia HG, Silveira CM & Salibe AA. 1976. Psorosis transmission through seeds of trifoliate orange. In: *Proceeding of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virology.* IOCV, Riverside. pp. 132-134.
- Cao MJ, Liu Q, Wang XF, Yang FY & Zhou CY. 2010. First report of Citrus bark cracking viroid and Citrus viroid V infecting citrus in China. *Plant Disease.* 94: 922.
- Cook G, van Vuuren SP, Breytenbach JHJ & Manicom BQ. 2012. Citrus Viroid IV Detected in Citrus sinensis and C. reticulata in South Africa. *Plant Disease* 96:772-772.
- da Graça JV, Douhan GW, Halbert SE, Keremane ML, Lee RF, Vidalakis G & Zhao H. 2016. Huanglongbing: An overview of a complex pathosystem ravaging the world's citrus. *J Integr Plant Biol.* 58(4):373-87. doi: 10.1111/jipb.12437.
- De Francesco A, Costa N, Plata MI & García ML. 2015. Improved detection of Citrus psorosis virus and coat protein-derived transgenes in citrus plants: comparison between RT-qPCR and TAS-ELISA. *J Phytopathology.* 163: 915–925. doi: 10.1111/jph.12392.
- DIEA 2019. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
- DIEA 2020. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/noticias/diea-presento-resultados-encuesta-citricola-primavera-2020>
- Donkersley P, Silva FWS, Carvalho CM, Al-Sadi AM & Elliot SM. 2018. Biological, environmental and socioeconomic threats to citrus lime production. *J Plant Dis Prot* 125, 339–356. <https://doi.org/10.1007/s41348-018-0160-x>
- EPPO 2019. <https://gd.eppo.int/taxon/CTV000/distribution/UY>
- Folimonova SY. 2013. Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology,* 4, 76.
- Gabriel D, Gottwald TR, Lopes SA & Wulff NA. 2020. Bacterial pathogens of citrus: Citrus canker, citrus variegated chlorosis and Huanglongbing. In *The Genus Citrus* (pp. 371-389). Woodhead Publishing.



- García ML. 2012. Ophioviruses: State of the Art, Viral Genomes - Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions. In: Prof. Maria Garcia, ISBN: 978-953-51-0098-0, InTech.
- García ML, Dal Bó E, da Graça JV, Gago-Zachert S, Hammond J, Moreno P, et al. 2017. ICTV taxonomy profile: Ophioviridae. *J. Gen. Virol.* 98, 1161–1162.
- Garnsey SM, Barrett HC & Hutchison DJ. 1987. Identification of Citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19, 187–191.
- Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W & Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: 3.0. *Syst. Biol.* 59:307–321.
- Guindon S & Gascuel O. 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52:696–704.
- Harper SJ, Cowell SJ & Dawson WO. 2015. Finding balance: virus populations reach equilibrium during the infection process. *Virology.* 485:205–212.
- Harper SJ. 2013. Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology.* 4:93.
- Hernandez-Rodriguez L, Bertalmio A, Rubio L, Roque R, Maeso D & Rivas F. 2020. Inability of the brown citrus aphid (*Toxoptera citricida*) to transmit citrus psorosis virus under controlled conditions. *Journal of Citrus Pathology*, 7(1).
- Hernández-Rodríguez L, Benítez-Galeano MJ, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Arruabarrena A, Rolón R, Colina R & Maeso D. 2019. Diversity of Uruguayan Citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology*, 44:352-362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>
- Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Arruabarrena A, Rubio L, Rivas F, Benítez-Galeano MJ, Colina R & Maeso D. 2017. First report of the citrus tristeza virus trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in 'Newhall' sweet orange in South America. *Plant Disease.* 101:1.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics.* 6 (2): 65–70.
- 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.
- Iwanami T. 2010. Properties and control of Satsuma dwarf virus. *JARQ.* 44(1), 1-6.
- Koch de Brotos L & Boasso C. 1955. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Ministerio de Ganadería y Agricultura, Montevideo.
- Lee RF. 2015. Control of virus diseases of citrus. In *Advances in Virus Research* (Vol. 91, pp. 143-173). Academic Press.
- Malfitano M, Barone M, Durán-Vila N & Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology.* 87: 115-121.
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí MR, Guerri J & Peña L. 2008. Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology.* 9:251–268.
- Murcia N, Serra P, Olmos A & Duran-Vila N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes.* 23: 95-102.
- Pagliano G, Umaña R, Pritsch C, Rivas F & Durán-Vila N. 2013. Occurrence, prevalence and distribution of citrus viroids in Uruguay. *Journal of Plant Pathology.* 95(3):631-635.
- Pagliano G, Orlando L & Gravina A. 1998. Detección y caracterización del complejo de viroides de los cítricos en Uruguay. *Agrociencia.* Vol 11. No 1. pag 74-83.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.
- Pujol AR & Beñatena HN. 1965. Study of psorosis in Concordia, Argentina In: *Proceedings of the 3th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV* (ed. W.C. Price). University of California, Riverside, CA, USA. pp. 170-179.
- Roistacher CN, da Graça JV & Müller GW. 2010. Cross protection against citrus tristeza virus - a review. In: Hilf ME, Timmer LW, Milne RG, da Graça JV (Eds.) *Proceeding of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virology.* IOCV, Riverside. pp. 1–27
- Roistacher CN. 1993. Psorosis: A Review. In: *12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists.* Riverside, CA, USA: IOCV pp. 139-154.
- Rubio L, Bertalmío A, Hernández-Rodríguez L, Benítez-Galeano MJ, Arruabarrena A, Rivas F, Colina R & Maeso D. 2019. Biological and molecular characterization of Uruguayan citrus tristeza virus field isolates. *Journal of Plant Pathology.* 101:97–105.
- Sanderson G, Falivene S & Hardy S. 2007. *Reworking Citrus Trees.* Primefact. 765:5. Orange, NSW: NSW Department of Primary Industries. [https://www.dpi.nsw.gov.au/\\_data/assets/pdf\\_file/0010/136675/Reworking-citrus-trees.pdf](https://www.dpi.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0010/136675/Reworking-citrus-trees.pdf)
- Singh RP, Ready KFM & Nie X. 2003. *Biology.* In: Hadidi A., Flores R., Randles J.W., Semancik J.S. (eds). *Viroids*, pp. 30- 48. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia.
- Spreen TH, Gao Z, Fernandes Jr W & Zansler ML. 2020. *Global economics and marketing of citrus products.* In *The Genus Citrus* (pp. 471-493). Woodhead Publishing.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, distance, and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution,* 28(10), 2731–2739.
- Tennant PF, Robinson D, Fisher L, Bennett SM, Hutton D, Coates-Beckford P & McLaughlin W. 2009. *Diseases and pests of Citrus (Citrus spp.).* *Tree and Forestry Science and Biotechnology,* 3(2), 81-107.



- Timmer LW & Gamsey SM. 1980. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV (eds: E.C. Calavan, S.M. Gamsey, L.W. Timmer), University of California, Riverside, CA, USA. pp. 167-173.
- Tucci JC, Quintela RD & Mousques RP. 1965. Virus diseases in Salto (Uruguay) In: 3d Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV pp. 220-222.
- Yokomi R, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumenti M, Saponari M, Giampetruzzi A, Weng Z, Xiong Z & Hajeri S. 2018. Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. Archives of Virology 163:1795-1804.
- Zhou C, da Graça JV, Freitas-Astúa J, Vidalakis G, Duran-Vila N & Lavagi I. 2020. Citrus viruses and viroids. In The Genus Citrus (pp. 391-410). Woodhead Publishing.

### 2.3. Benítez-Galeano *et al.* 2017\_The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the NC lineage of CTV

El presente trabajo contribuyó con la caracterización evolutiva del linaje NC, actualmente llamado HA16-5, que presenta una elevada incidencia en el Uruguay. Mediante análisis bayesiano se logró establecer la tasa evolutiva del linaje, así como la trayectoria de dispersión geográfica a nivel mundial. También logramos establecer los años de ingreso del linaje al país y la dinámica poblacional, observando una expansión local en Uruguay durante su segundo ingreso. Estos estudios permiten comprender en mayor profundidad el comportamiento de este linaje de importancia para el país.

Estos resultados permitieron cumplir los objetivos específicos 2.1.6 y 2.1.7.

Los resultados fueron publicados en la revista *Viruses*: **Benítez-Galeano MJ, Castells M & Colina R. 2017.** The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the NC lineage of CTV. *Viruses*. 9, 272. doi: 10.3390/v9100272.

Article

# The Evolutionary History and Spatiotemporal Dynamics of the NC Lineage of Citrus Tristeza Virus

María José Benítez-Galeano <sup>†</sup> , Matías Castells <sup>†</sup>  and Rodney Colina <sup>\*</sup>

Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Regional Litoral Norte (CENUR Litoral Norte), Universidad de la República (UdelaR), Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay; mbenitezgaleano@gmail.com (M.J.B.-G.); matiascastellsbauer@gmail.com (M.C.)

<sup>\*</sup> Correspondence: rodneycolina1@gmail.com; Tel.: +598-473-42924

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 3 August 2017; Accepted: 21 September 2017; Published: 12 October 2017

**Abstract:** Citrus tristeza virus (CTV) is a major pathogen affecting citrus trees worldwide. However, few studies have focused on CTV's evolutionary history and geographic behavior. CTV is locally dispersed by an aphid vector and long distance dispersion due to transportation of contaminated material. With the aim to delve deeper into the CTV-NC (New Clade) genotype evolution, we estimated an evolution rate of  $1.19 \times 10^{-3}$  subs/site/year and the most common recent ancestor in 1977. Furthermore, the place of origin of the genotype was in the United States, and a great expansion of the population was observed in Uruguay. This expansion phase could be a consequence of the increment in the number of naïve citrus trees in Uruguayan orchards encompassing citrus industry growth in the past years.

**Keywords:** citrus tristeza virus; evolution rate; phylogeography; NC genotype

## 1. Introduction

RNA viruses have a great potential for rapid evolution due to the high mutation rates, large population sizes, and short generation times [1]. This rapid evolution means that epidemiological and evolutionary processes occur on a time scale of a few years.

Citrus tristeza virus (CTV; genus *Closterovirus*, family *Closteroviridae*) is one of the most destructive pathogens that affect citrus trees worldwide [2]. The CTV genome is a single-stranded positive sense RNA molecule of approximately 19.3 kb in length containing 12 open reading frames that encodes for at least 19 protein products, including replication proteins, cell-to-cell movement proteins, virion assembly proteins, suppressors of RNA silencing proteins, and two capsid proteins [3–6]. p25 is a multifunctional protein involved in the suppression of intercellular RNA silencing and works as a capsid protein covering 95% of the virus genome [3,6].

Natural CTV hosts essentially include species of the genera *Citrus* and *Fortunella*, and depending on the virus strains and on the species or scion–rootstock combinations, CTV may cause three distinct syndromes named quick decline, stem pitting, and seedling yellows [2]. As an aphid-borne virus transmitted in a semi-persistent manner, CTV is mainly transmitted by vector species from the genera *Toxoptera* and *Aphis*, which locally spread the virus within a given citrus producing area. Long-distance dissemination is caused principally by the transportation of infected material [2].

Like most RNA viruses, CTV exists in nature as a mixture of genetic variants that coexist in the same plant displaying high levels of genetic and phenotypic diversity [7]. Genetic studies of different strains of CTV revealed the existence of seven distinct genetic lineages or genotypes worldwide, known

which the complete genomes are available, grouping into a clade with nucleotide sequence identities higher than 98.7% for *p25* gene between strains [13].

CTV biology has been intensively studied for many decades, but evolutionary and spatiotemporal phylodynamic studies, which can provide relevant information for understanding the emergence of new viral diseases, genotypes, or genetic variants and for designing more efficient strategies for disease control, have not been conducted in-depth. In this matter, few studies have focused on CTV's evolutionary history with reference to geography [12,14,15]. The whole CTV genome evolutionary rate, from an infectious clone introduced by bark-flap inoculation into *C. macrophylla*, has been calculated to be 7 years after inoculation and was in the order of  $10^{-5}$  substitutions per site per year (s/s/y) [12]. This parameter was also calculated for *p20* and *p25* genes, in both cases resulting one order of magnitude higher ( $10^{-4}$  s/s/y) than that for the complete genome estimation [14,15]. In the same article, Silva and co-workers [14] estimated the time of the most recent common ancestor (tMRCA) of CTV lineages based on the *p25* gene. Nevertheless, these parameters were estimated for all CTV extant genotypes described at the moment of publication of the respective articles, highlighting the fact that the NC genotype has not yet been described. Another important contribution regarding the geographic behavior of CTV was made by Davino and co-workers [15], who studied the genetic relationship among CTV strains from Sicily, Italy, and evaluated the geographical and temporal dissemination of the virus in the island. Their results suggest that mild and severe CTV isolates belonging to five different clades (lineages) were introduced in Sicily in 2002.

With the aim to describe the spatiotemporal dynamics of the new NC-CTV genotype, which is highly represented in Uruguayan citrus orchards, we performed a Bayesian analysis of 123 dated sequences belonging to the aforementioned genotype. Sequences from Africa, Asia, Europe, North America, and South America were included in the analysis, and the ancestor of the NC genotype was dated as well as its evolutionary rate based on the *p25* coding region. We also delineated the possible geographic dispersion route of the virus since its origin until 2015. To our knowledge, this is the first exhaustive report of the evolutionary and geographical behavior of the NC genotype, from which an exhaustive characterization remains incomplete.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Sequence Dataset

A total of 123 sequences of CTV *p25* gene and associated information including collection date and location were retrieved from the NCBI nucleotide database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) to perform the analyses. The dataset comprises sequences collected between 1979 and 2015 from different countries, including Angola, Argentina, Brazil, China, Greece, India, Portugal, Sao Tomé and Príncipe, Taiwan, United States, and Uruguay. The Uruguayan sequences used in the present work were obtained from samples processed by our group (Table S1).

### 2.2. Phylogenetic Analysis

CTV sequences were aligned with ClustalW in MEGA 6.0 (available online: <http://www.megasoftware.net/>) generating a sequence alignment of 572 nucleotides in length covering positions 16130–16702 (NCBI nucleotide sequence accession number U56902) [16].

In order to prevent bias in the phylogenetic, phylodynamic, and phylogeographic analyses, we used the RDP, GENECONV, MAXCHI, CHIMAERA, 3SEQ, BOOTSCAN, LARD, and SISCAN heuristic recombination detection methods implemented in the RDP4 software package with default settings [17–25]. No recombinant sequences were identified, nor was there any evidence for phylogenetic incongruence among the sequences analyzed here.

The model of nucleotide substitution that best fit the dataset (HKY) was selected using the

The heuristic tree search was performed using the SPR branch-swapping algorithm and branch support was calculated with the approximate likelihood-ratio (aLRT) SH-like test [30].

### 2.3. *Phyldynamic and Phylogeographic Approaches*

The time of most recent common ancestor (tMRCA), the evolutionary rate of the new CTV genotype (NC) and its demographic history in Uruguay were jointly inferred using the Bayesian Markov Chain Monte Carlo (MCMC) statistical framework implemented in the BEAUti/BEAST package v1.8.0 (available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/beast/>) [31].

The TempEst program was used to determine that sequences used in this work showed temporal structure to proceed with molecular clock analyses.

The HKY nucleotide substitution model was determined to be the best fit with the dataset and the lognormal relaxed (uncorrelated) molecular clock model was used [14,32,33]. Bayesian analyses were conducted with the available tree priors described by Silva and co-workers [14] for the *p25* gene and the best demographic model was evaluated through Bayes Factor; the Bayesian Skyline coalescent tree prior was used [34]. A Markov Chain Monte Carlo (MCMC) process was run for 200 million generations, and the results were visualized with Tracer v1.5.0 program (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>) discarding the initial 10% of the run as burn-in. The effective sample size (ESS) values were checked to evaluate the convergence of the analysis, accepting only values higher than 200 for all the parameters. The demographic history of the new CTV clade in Uruguay was represented graphically with Tracer v1.5.0, through the effective number of infections as a function of time.

Phylogeographic analysis was conducted with HKY nucleotide substitution model, lognormal relaxed (uncorrelated) molecular clock model and a Bayesian skyline coalescent tree prior. Using the evolutionary rate estimated in this work and a Bayesian stochastic search variable selection (BSSVS), MCMC processes were run for 200 million generations. ESS values were checked to evaluate the convergence of the analysis, accepting only values higher than 200 for all the parameters. The Maximum Credibility Clade Tree (MCCT) was obtained with TreeAnnotator v1.8.0 of BEAUti/BEAST package and visualized with FigTree v 1.4.0 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Phylogeographic dissemination pattern was visually determined with SPREAD v 1.0.6 and KMZ file was visualized with Google Earth® [35]. The KMZ file is available from the authors upon request.

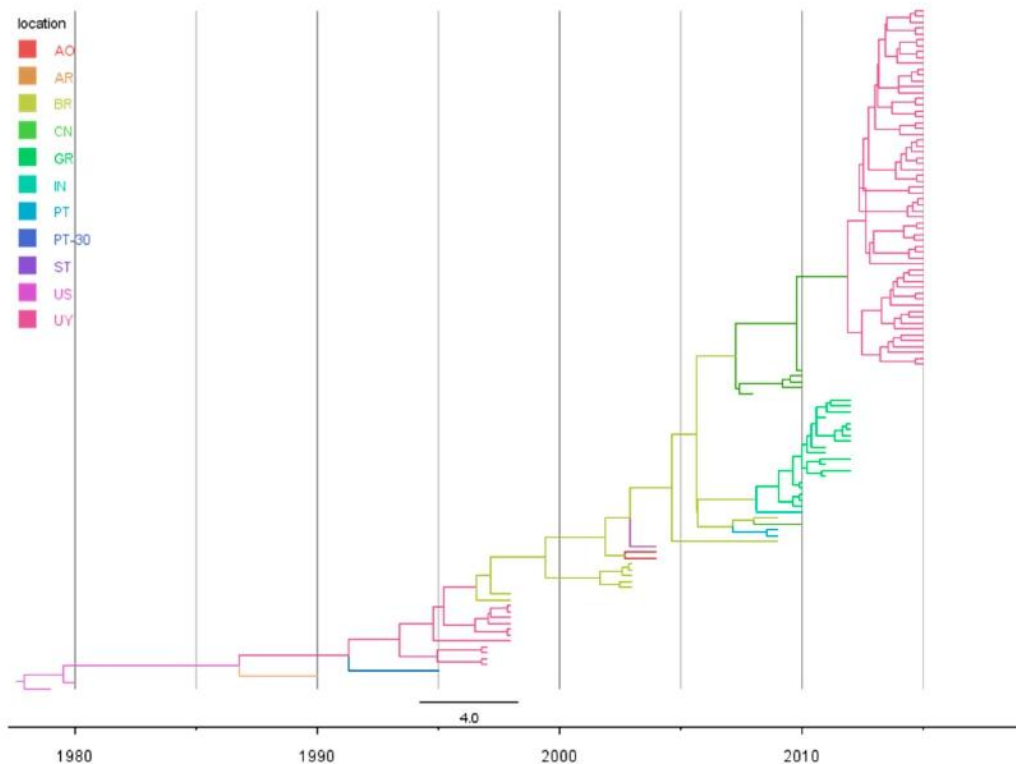
## 3. Results

### 3.1. *The Monophyly and Temporal Signal of the Data Set*

In order to test that the Uruguayan field samples collected in 2015 belonging to the NC genotype, a phylogenetic analysis with the ML method was performed, and the tree showed that all the sequences used in this work clustered as a highly supported monophyletic group (aLRT = 1) (Figure S1). Another important fact to take into account when Bayesian approaches are used is that the dataset must have temporal signal and are not the result of artefactual nucleotide changes in the sequences [36,37]. We estimated the temporal signal with TempEst software (available online: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tempest/>) [38] and sequences with incongruent data/variability were discarded.

### 3.2. *Rates and Dates of Evolution*

Our Bayesian coalescent estimates of evolutionary dynamics, based on the *p25* gene, indicate that the CTV-NC genotype evolves at a rate of  $1.19 \times 10^{-3}$  subs/site/year (95% HPD,  $1.72 \times 10^{-3} - 7.1 \times 10^{-4}$  subs/site/year). This rate was used to estimate times to common ancestry. Based on the MCCT (Figure 1), the most plausible place of origin of the new CTV-NC genotype data



**Figure 1.** Time-scaled Bayesian MCC phylogeny of CTV-NC genotype. Sequences from different countries encompassing the *p25* gene were used to phylogeny reconstruction. Branches were colored according to the most probable location of their parental nodes. AO: Angola; AR: Argentina; BR: Brazil; CN: China; GR: Greece; IN: India; PT: Portugal; PT-30: Madeira Island; ST: Sao Tomé and Príncipe; US: United States; UY: Uruguay.

With respect to the spatio-temporal dynamics of the genotype, the results are summarized on an MCC tree with branches colored according to the most probable location of their parental nodes (Figure 1), and with a map representing the most significant migration routes among countries between 1977 and 2015 (Figure 2).

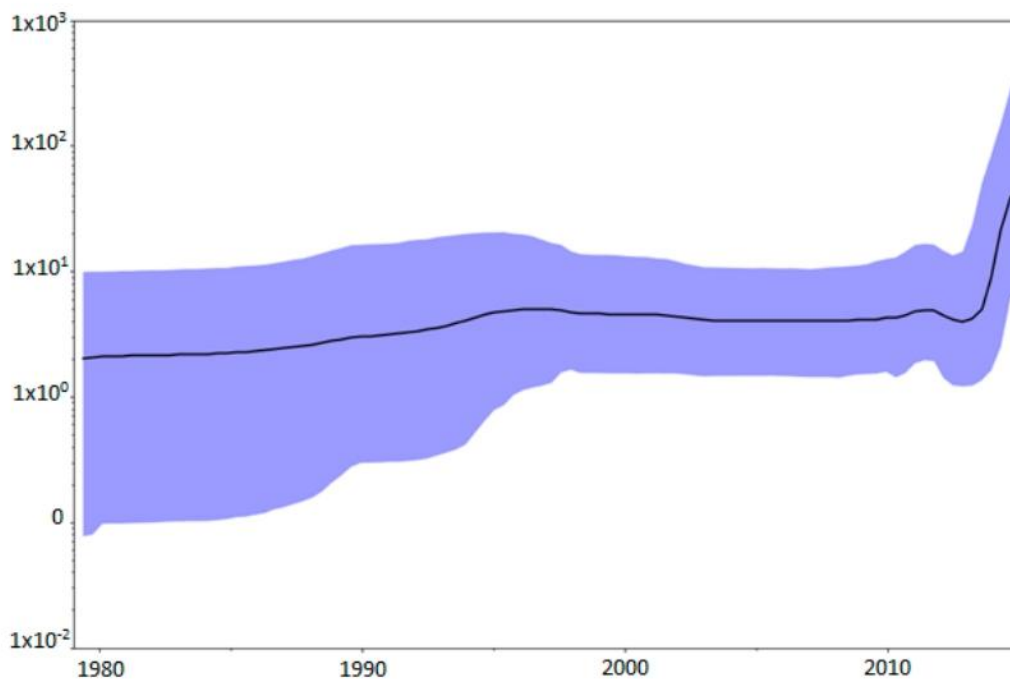
As can be seen in both Figures 1 and 2, after its origin in 1977, the virus began to move from the US to different countries. In 1986 (1980–1990) NC-genotype viruses spread to Argentina and 5 years later, in 1991 (1987–1994) the virus arrived to Uruguay from its neighboring country (Figure 2). After 1991, the virus moved from Uruguay to Madeira Island in Portugal and to Brazil in 1996 (1994–1998) (Figure 2). After its arrival in 1996 to Brazil, the virus continued spreading to Angola in 2002 (2001–2004) and to Sao Tomé and Príncipe (Figure 2). In 2007, the virus genotype moved from Brazil to Asia, specifically to China with a 95% HPD interval ranging from 2006 to 2008. In 2008, the virus moved from Brazil to mainland Portugal (2007–2009) and to Greece (2005–2009), and from the latter moved to India after 2008 (Figure 2). Finally, a second introduction of the virus from China to Uruguay occurred in 2012 (2010–2013) with an important local expansion of the population after its arrival (Figure 2).



**Figure 2.** Spatiotemporal dynamics of CTV-NC genotype circulating in the world. Dispersal pattern (blue arrows) between 1977 and 2015, reconstructed from the MCC tree and the probably year of arrival to each country (blue squares with the year) are shown. The local expansion occurred in Uruguay is shown (light blue circle). Map was adapted from Google Maps® (Google®, Mountain View, California, United States).

### 3.3. Evolutionary History of the Genotype

The demographic reconstruction of this new genotype, observed in the Skyline plot (Figure 3), showed that the viral population size can be divided into two different phases.



**Figure 3.** Population dynamics of the CTV-NC genotype. The demographic history of the genotype is shown since its origin in 1977 until the most recent sequence of the dataset, 2015. The Bayesian Skyline plot shows the evolution in population size. Median (dark line) and upper and lower 95% HPD (blue region) estimates of effective population size ( $\nu$ -axis) through time in years ( $x$ -axis) are shown.



The first phase shows that the population size remained constant since its origin until around 2012. In the second phase, we can observe an increment of one log of the population size around this date until 2015, the date of the most recent sequences of our dataset, suggesting that the population is growing.

#### 4. Discussion

The monophyly of the NC genotype jointly with the fact that no recombinant sequences were found among the strains used in the present work are important in order to avoid bias in the subsequent phylodynamic and phylogeographic analyses.

The substitution rate obtained in the present work is similar to values reported for other RNA viruses [39]. Nevertheless, Silva and co-workers [14] recently described the gene evolutionary rate in the order of  $10^{-4}$  subs/site/year, although their calculations were made for all the CTV circulating genotypes at once. It has been proposed that, with the emergence of a new variant or during an outbreak, the evolutionary rate of a virus is faster and becomes slower and reaches the equilibrium after a period of time [40,41]. In this case, this is the first calculation of the CTV-NC genotype evolutionary rate apart from the other circulating genotypes being maybe the explanation for the difference between values.

Related to the ancestor, there is only one previous report of the tMRCA for all the existing CTV genotypes [14] in which the ancestor of the clade corresponding to the NC genotype (Group 5 Nolasco's typing system) was located between 37 and 431 years before 2010 (1579–1973). Despite the broad range obtained by the authors, which may simply reflect the heterogeneity in divergence times for the different CTV genotypes on which the calculations were based, our results are consistent with this.

The continuous movement of infected material, probably in an illegal manner despite the strict sanitary programs of every citrus-growing country, allows this virus genotype to spread continuously. Although this is the first report of the most probable dissemination dates and geographic locations of the CTV-NC genotype, our calculations predict that the virus was present 2–4 years before the first report of this genotype in every country where Group 5 of Nolasco's typing system was used to report it [42,43]. This result is consistent with a scenario in which the virus remains undetected until the number of infections reaches a detection threshold.

With respect to the spatio-temporal dynamics of the genotype in Uruguay, our results are in agreement with the two different introductions of the virus in the country, and it seems that the population size is growing since the second entrance of the genotype in Uruguay. The local expansion after the second introduction of the virus are confirmed by the high prevalence of this genotype in the country [13]. This population growth could be in agreement with the increment of the number of naïve citrus trees in Uruguayan orchards to encompass the citrus industry increase. Nevertheless, to confirm that the population is still growing, further analyses and continuous vigilance of citrus trees is needed. It has also been shown that temperature has an impact in virus population dynamics, favoring the spreading of thermo-tolerant variants at the expense of a diminished replication of other variants [44]. However, to confirm this hypothesis, further analyses are needed.

#### 5. Conclusions

CTV has been moving around the world since the origin of modern citrus-growing techniques. The movement of contaminated material and the local dispersion of the virus by aphids after its arrival to a new place, together with an increasing number of naïve trees are the perfect scenario to a new virus genotype to rise. In the present work, we describe for the first time the dispersion pattern of the recently described NC-genotype around the world as well as the date of origin and its evolutionary rate. In particular, we describe a possible scenario to explain a local growth of its population in Uruguayan citrus orchards, which is in agreement with the emergence of a new variant

to develop a genotype-specific cross-protection program against this highly represented genotype in Uruguay.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/1999-4915/9/10/272/s1](http://www.mdpi.com/1999-4915/9/10/272/s1).

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Estefany Bertoni for collection and processing of the samples. The funding for this research was from the National Institute of Agricultural Research, project INIA FPTA-310. MJB-G is recipient of a PhD fellowship from the Academic Postgraduate Commission, Universidad de la República-Uruguay. MC is recipient of a PhD fellowship from the National Agency for Research and Innovation (ANII) and the National Institute of Agricultural Research of Uruguay.

**Author Contributions:** María José Benítez-Galeano, Matías Castells, and Rodney Colina conceived and designed the experiments; María José Benítez-Galeano performed the laboratory bench experiments; María José Benítez-Galeano and Matías Castells performed the computational analysis of the data; María José Benítez-Galeano, Matías Castells, and Rodney Colina wrote the paper.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The founding sponsor had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

## References

- Domingo, E.; Holland, J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* **1997**, *51*, 151–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Moreno, P.; Ambros, S.; Albiach-Martí, M.R.; Guerri, J.; Peña, L. Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* **2008**, *9*, 251–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karasev, A.V.; Boyko, V.P.; Gowda, S.; Nikolaeva, O.V.; Hilf, M.E.; Koonin, E.V.; Niblett, C.L.; Cline, K.; Gumpf, D.J.; Lee, R.F.; et al. Complete Sequence of the Citrus Tristeza Virus RNA Genome. *Virology* **1995**, *208*, 511–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Satyanarayana, T.; Gowda, S.; Mawassi, M.; Albiach-Martí, M.R.; Ayllón, M.A.; Robertson, C.; Garnsey, S.M.; Dawson, W.O. Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. *Virology* **2000**, *278*, 253–265. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ayllon, M.A.; Lopez, C.; Navas-Castillo, J.; Garnsey, S.M.; Guerri, J.; Flores, R.; Moreno, P. Polymorphism of the 5' terminal region of Citrus tristeza virus (CTV) RNA: Incidence of three sequence types in isolates of different origin and pathogenicity. *Arch. Virol.* **2001**, *146*, 27–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lu, R.; Folimonov, A.; Shintaku, M.; Wan-Xiang, L.; Falk, B.W.; Dawson, W.O.; Ding, S. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15742–15747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rubio, L.; Ayllon, M.A.; Kong, P.; Fernandez, A.; Polek, M.L.; Guerri, J.; Moreno, P.; Falk, B.W. Genetic variation of Citrus tristeza virus isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol.* **2001**, *75*, 8054–8062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hilf, M.E.; Karasev, A.V.; Albiachi-Martí, M.R.; Dawson, W.O.; Garnsey, S.M. Two paths of sequence divergence in the Citrus tristeza virus complex. *Phytopathology* **1999**, *89*, 336–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hilf, M.E.; Mavrodieva, V.A.; Garnsey, S.M. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of Citrus tristeza virus: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* **2005**, *95*, 909–917. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harper, S.J.; Dawson, T.E.; Pearson, M.N. Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Arch. Virol.* **2010**, *155*, 471–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Roy, A.; Brlansky, R.H. Genome Analysis of an Orange Stem Pitting Citrus Tristeza Virus Isolate Reveals a Novel Recombinant Genotype. *Virus Res.* **2010**, *151*, 118–130. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Harper, S.J. Citrus tristeza virus: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Front Microbiol.* **2013**, *4*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Benítez-Galeano, M.J.; Rubio, L.; Bertalmío, A.; Maeso, D.; Rivas, F.; Colina, R. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Silva, G.; Marques, N.; Nolasco, G. The evolutionary rate of citrus tristeza virus ranks among the rates of the slowest RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **2012**, *93*, 419–429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Davino, S.; Willemsen, A.; Panno, S.; Davino, M.; Catara, A.; Elena, S.F.; Rubio, L. Emergence and Phylodynamics of Citrus Tristeza Virus in Sicily, Italy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e66700. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725–2729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Martin, D.P.; Rybicki, E. RDP: Detection of Recombination Amongst Aligned Sequences. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 562–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Padidam, M.; Sawyer, S.; Fauquet, C.M. Possible Emergence of New Geminiviruses by Frequent Recombination. *Virology* **1999**, *265*, 218–225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Maynard Smith, J. Analyzing the Mosaic Structure of Genes. *J. Mol. Evol.* **1992**, *34*, 126–129.
20. Posada, D.; Crandall, K.A. Evaluation of Methods for Detecting Recombination from DNA Sequences: Computer Simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13757–13762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Boni, M.F.; Posada, D.; Feldman, M.W. An Exact Nonparametric Method for Inferring Mosaic Structure in Sequence Triplets. *Genetics* **2007**, *176*, 1035–1047. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Salminen, M.O.; Carr, J.K.; Burke, D.S.; McCutchan, F.E. Identification of Breakpoints in Intergenotypic Recombinants of HIV Type 1 by BOOTSCANing. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* **1995**, *11*, 1423–14215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Holmes, E.C.; Worobey, M.; Rambaut, A. Phylogenetic Evidence for Recombination in Dengue Virus. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Gibbs, M.J.; Armstrong, J.S.; Gibbs, A.J. Sister-Scanning: A Monte Carlo Procedure for Assessing Signals in Recombinant Sequences. *Bioinformatics* **2000**, *16*, 573–582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Martin, D.P.; Murrell, B.; Golden, M.; Khoosal, A.; Muhire, B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* **2015**, *1*, vev003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Posada, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 1253–1256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control* **1974**, *19*, 716–723. [[CrossRef](#)]
28. Guindon, S.; Gascuel, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* **2003**, *52*, 696–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Guindon, S.; Dufayard, J.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Anisimova, M.; Gascuel, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* **2006**, *55*, 539–552. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Drummond, A.J.; Rambaut, A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* **2007**, *7*, 214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Ho, S.Y.; Phillips, M.J.; Drummond, A.J.; Cooper, A. Accuracy of rate estimation using relaxed-clock models with a critical focus on the early metazoan radiation. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 1355–1363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Drummond, A.J.; Ho, S.Y.W.; Phillips, M.J.; Rambaut, A. Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Drummond, A.J.; Rambaut, A.; Shapiro, B.; Pybus, O.G. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 1185–1192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bielejec, F.; Rambaut, A.; Suchard, M.A.; Lemey, P. SPREAD: Spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 2910–2912. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Duffy, S.; Holmes, E.C. Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: Phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 1539–1547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ramsden, C.; Holmes, E.C.; Charleston, M.A. Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: No evidence for co-divergence. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 143–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Rambaut, A.; Lam, T.T.; de Carvalho, L.M.; Pybus, O.G. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst. *Virus Evol.* **2016**, *2*, vev007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

40. Meyer, A.G.; Spielman, S.J.; Bedford, T.; Wilke, C.O. Time dependence of evolutionary metrics during the 2009 pandemic influenza virus outbreak. *Virus Evol.* **2015**, *1*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Park, D.J.; Dudas, G.; Wohl, S.; Goba, A.; Whitmer, S.L.; Andersen, K.G.; Sealfon, R.S.; Ladner, J.T.; Kugelman, J.R.; Matranga, C.B.; et al. Ebola Virus Epidemiology, Transmission, and Evolution during Seven Months in Sierra Leone. *Cell* **2015**, *161*, 1516–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Silva, G.; Fonseca, F.; Santos, C.; Nolasco, G. Presence of Citrus Tristeza Virus in Angola and São Tomé e Príncipe: Characterization of isolates based on coat protein gene analysis. *J. Plant Pathol.* **2007**, *89*, 149–152.
43. Owen, C.; Mathioudakis, M.; Gazivoda, A.; Gal, P.; Nol, N.; Kalliampakou, K.; Figas, A.; Bellan, A.; Iparaguirre, A.; Rubio, L.; et al. Evolution and molecular epidemiology of Citrus Tristeza virus on Crete: Recent introduction of a severe strain. *J. Phytopathol.* **2014**, *162*, 839–843. [[CrossRef](#)]
44. Cowell, S.J.; Harper, S.J.; Dawson, W.O. Some like it hot: Citrus tristeza virus strains react differently to elevated temperature. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 3567–3570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

### **3. CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA, MOLECULAR Y EVOLUTIVA DE SUBAISLADOS DE CTV**

#### **3.1. Objetivos específicos**

- 3.1.1. Comprobar la existencia de un único tipo de variante genética mediante la técnica Single Strand Chain Polymorphism (SSCP).
- 3.1.2. Realizar la caracterización biológica de subaislados de CTV de interés en plantas indicadoras.
- 3.1.3. Obtener el genoma completo de los subaislados mediante secuenciación masiva.
- 3.1.4. Establecer el grado de variabilidad genética intra poblacional de los subaislados secuenciados.
- 3.1.5. Realizar estudios de recombinación genética con los genomas completos obtenidos.
- 3.1.6. Realizar estudios filogenéticos de los genomas completos.

### 3.1. **Hernández-Rodríguez *et al.* 2019: Diversity of Uruguayan CTV populations segregated after single-aphid transmission**

En el presente trabajo se realizó la caracterización biológica y molecular de aislados de campo de CTV, así como también de los propios subaislados obtenidos mediante transmisión por un solo áfido, utilizando el vector *Toxoptera citricida*. La caracterización molecular, mediante los genes p20, p23 y p25, de los aislados madre y subaislados permitió observar de manera general la estructura de las poblaciones en campo y segregadas. La importancia de la segregación poblacional radica en la utilización de aislados homogéneos para el establecimiento de la protección cruzada.

A partir de este trabajo se obtuvieron los subaislados del aislado madre DSST utilizados en la presente tesis. Indirectamente, estos resultados contribuyeron con los objetivos específicos 3.1.1. y 3.1.2.

Los resultados se publicaron en la revista *Tropical Plant Pathology*: Hernández-Rodríguez L, **Benítez-Galeano MJ**, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Arruabarrena A, Rolón R, Colina R & Maeso D. **2017**. *Trop Plant Pathol.* 44; 352-362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>



# Diversity of Uruguayan citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission

Lester Hernández-Rodríguez<sup>1</sup> · María José Benítez-Galeano<sup>2</sup> · Ana Bertalmío<sup>1</sup> · Leticia Rubio<sup>1</sup> · Fernando Rivas<sup>1</sup> · Ana Arruabarrena<sup>1</sup> · Rodolfo Rolón<sup>1</sup> · Rodney Colina<sup>2</sup> · Diego Maeso<sup>3</sup>

Received: 16 November 2018 / Accepted: 10 April 2019 / Published online: 6 May 2019  
© Sociedade Brasileira de Fitopatologia 2019

## Abstract

Prevalence of citrus tristeza virus (CTV) isolates causing severe stem pitting symptoms with a high diverse genetic composition represents a threat for citrus crops in Uruguay. This work aimed to characterize viral components of CTV populations segregated by single aphid (*Toxoptera citricida*) transmission (SAT). Thirty-nine SAT-derived sub-isolates were obtained from six CTV field isolates. Only eight were MCA13 non-reactive, and six of them, together with other three MCA13 reactive sub-isolates, were considered mild by the intensity of their reaction in ‘Mexican’ lime, ‘Madam Vinous’ sweet orange, ‘Duncan’ grapefruit and sour orange indicator plants. Fourteen sub-isolates, including two MCA13 non-reactive, were considered moderate, and the remaining sub-isolates were all MCA13 reactive and with severe reactions in the indicator plants. Sequence comparisons of the p20, p23 and p25 genes showed a high inter (among all isolates and their derived sub-isolates)- and intra (among each isolate and its derived sub-isolates)-specific evolutionary diversity, with the presence of the CTV strains VT, T3, RB, and NC in mixtures of their complex populations. Together, our data revealed the heterogeneity of the Uruguayan CTV populations in these CTV field isolates. The results provide additional biological and molecular information on the complex CTV populations in Uruguay and must be considered for improving the CTV management program.

**Keywords** *Closterovirus* · *Toxoptera citricida* · Biological indexing · CTV · SAT

## Introduction

Citrus tristeza virus (CTV; *Closteroviridae*, *Closterovirus*) is the causal agent of a major disease of citrus crops worldwide (Moreno et al. 2008). CTV infection causes three main syndromes: tristeza or decline (D) of citrus species grafted on sour

orange (*Citrus aurantium* L.), stem pitting (SP) of all *Citrus* species and cultivars regardless of the rootstock, and seedling yellows (SY) of sour orange, grapefruit (*C. paradisi* Macf.) or lemon [*C. limon* (L.) Burm. f.] seedlings (Moreno et al. 2008). A complete lack of symptoms has also been observed in several citrus regions of the world, even in plants with high CTV titer (Moreno et al. 2008; Dawson et al. 2015). The development of the disease is complex, varying from mild to severe symptoms depending mainly on the CTV circulating strains, viral composition of the infecting populations and cultivar-rootstock combinations (Harper et al. 2015a).

The genome of CTV consists of a ~19.3 kb positive-sense single-stranded RNA molecule comprising 12 open reading frames (ORFs) and two untranslated regions (UTRs) located at its 5' and 3' ends (reviewed by Moreno et al. 2008). The major coat protein p25 (CP) and the p20 and p23 proteins act as RNA silencing suppressors, among other functions (Moreno et al. 2008). CTV spreads to new geographical regions by the movement of infected plant material (Moreno et al. 2008). Locally, the virus is transmitted in a semi-persistent manner by several aphid species, with *Toxoptera*

Section Editor: Juliana Freitas-Astua

✉ Lester Hernández-Rodríguez  
lesterhernandez@inia.org.uy; lesterhernandezift@gmail.com

- <sup>1</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Salto Grande, Camino al Terrible, 50000 Salto, Uruguay
- <sup>2</sup> Laboratorio de Virología Molecular, Centro Universitario Regional Noroeste (CENUR Noroeste), Universidad de la República, Rivera 1350, 50000 Salto, Uruguay
- <sup>3</sup> Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay

*citricida* Kirkaldi and *Aphis gossypii* Glover as the main vectors (Bar-Joseph et al. 1989; Timmer et al. 2000).

Infected field trees commonly harbor a CTV population containing a mixture of strains that eventually can increase in complexity due to re-inoculation of different variants or strains, or by natural generation of recombinants (Roy and Brlansky 2009; Harper 2013). The current CTV strain classification, based on complete genome sequences, recognizes at least six strains: T36, VT, T3, RB, T68 and T30, causing a wide range of symptoms (Harper 2013). Benítez-Galeano et al. (2015) proposed a seventh strain named NC represented by the isolate HA16–5.

In Uruguay, around 95% of the cultivated citrus species are grafted onto *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. or its hybrid ‘Citrange’ (*C. sinensis* x *P. trifoliata*). CTV and its vector *T. citricida* have an endemic distribution in the country (Koch de Brotos and Boasso 1955). Recent studies revealed the presence of VT, T3, T36, RB and NC strains, as well as complex genetic mixtures of CTV populations (Benítez-Galeano et al. 2015; Hernández-Rodríguez et al. 2017) and the spread of severe SP-causing isolates (Rubio et al. 2019). Since the presence of severe SP-causing isolates could be affecting productivity and fruit quality in Uruguay, the implementation of a long-term cross-protection program is essential to complement the ongoing National Citrus Sanitation Program. This work describes the biological, serological and molecular characterization of viral components of CTV populations of a discrete set of Uruguayan field isolates segregated by single aphid transmission (SAT), providing additional information on the complexity of this virus circulating in the country.

## Materials and methods

### CTV field isolates

Field isolates used as CTV sources were collected from adult trees older than 15 years. Isolates DSST and I58 were recovered from asymptomatic ‘Navelina’ and ‘Navel Lane Late’ sweet orange (*C. sinensis*) trees, respectively, near Salto city (Salto Department). SNH and SAG4 isolates were recovered from asymptomatic ‘Newhall’ and ‘Navel Lane Late’ sweet orange trees, respectively, at Constancia (Paysandú Department). The SACH isolate was obtained from a stunted and wilted ‘Navel Lane Late’ sweet orange tree at Paysandú Department. The TR7 isolate was collected in 1990 from an asymptomatic tree in a commercial ‘Criollo’ lemon (*C. limon*) orchard at the Southern region of Uruguay. All these field isolates (hereinafter “CTV isolates”) were recently characterized by Rubio et al. (2019). The isolates were grafted on ‘Mexican’ lime (ML) [*C. aurantifolia* (Christm.) Swing.] seedlings and were kept in single pots in an insect-proof

temperature-controlled (18–27 °C) glasshouse following standard procedures (Roistacher 1991). CTV infection in all the plants used as CTV sources was confirmed by Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immunosorbent Assay (DAS-ELISA), as described below.

### Establishment of *Toxoptera citricida* CTV-free colonies

CTV-free colonies of brown citrus aphid (*T. citricida*; BrCA) were established following the procedure described by Lin et al. (2002), using ‘Etrog’ citron (*C. medica* L.) seedlings as hosts. These plants were maintained in 0.35 m × 0.45 m × 0.5 m cages (l/w/h) covered with anti-aphid mesh inside a temperature-controlled glasshouse (24–26 °C). Plants bearing BrCA colonies were analyzed monthly to confirm the CTV-free status of the colony by DAS-ELISA as described below.

### Single aphid transmission (SAT) assay

For SAT assays, groups of about 60–80 apterous BrCA adults were fed on shoots of each source of CTV isolate during an acquisition-access period (AAP) of 24 h, under controlled conditions (24–26 °C). After the AAP, each CTV-infected BrCA was placed onto a shoot of one ML receptor seedling (40–50 cm height and ~1 cm stem diameter) using a paintbrush and left for feeding during a 48 h inoculation-access period (IAP). Each CTV isolate source was SAT inoculated to 28 ML seedlings (denominated as “sub-isolates” and followed by the name of the CTV isolate source and a number representing the SAT sub-isolate, e.g. SNH-1). SAT-inoculated ML plants were maintained in an insect-proof temperature-controlled (18–27 °C) glasshouse and CTV infection progress in all ML receptor plants was monitored by symptom observation and DAS-ELISA (as described below).

### Bioindexing of the CTV isolates and sub-isolates

All the isolates used as CTV source, and their derived sub-isolates, were indexed by biological assays using the *Citrus* indicator hosts: Mexican lime (ML), sour orange (SO), ‘Duncan’ grapefruit (DG; *C. paradise*) and ‘Madame Vinous’ sweet orange (MV; *C. sinensis*) as recommended (Garnsey et al. 1987). Inoculations were carried out by grafting two bark patches of each individual isolate or sub-isolate in three replicas of each citrus indicator host. Four negative controls (CTV-free seedlings) and four positive controls (local CTV isolates used as positive controls by the Citrus Sanitation and Certification Program of Uruguay) were included per indicator species. The assay was conducted in an insect-proof temperature-controlled (18–27 °C) greenhouse. CTV infection in all the inoculated indicator plants was confirmed by DAS-ELISA as described below. Foliar evaluated



symptoms included vein clearing (VC), leaf cupping (LC) and vein corking (Vck) in ML, and seedling yellows in SO and DG, periodically registered after growth flushes. Stem pitting (SP) was evaluated at the end of tests (10–12 months post-inoculation) by peeling stems above the inoculation point. Stunting was assessed visually in SO and DG. Intensity of each symptom was rated as: 0 = asymptomatic, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe. Total evaluation period was one year.

Readings of the different symptoms observed in the three indicator plants of each host inoculated with an individual isolate or sub-isolate were converted to a numerical index following the procedure proposed by Garnsey et al. (1987). The average of intensity (R) in each indicator host was calculated as the average of symptom intensity observed in the three replicas inoculated (e.g. in the assay on ML for one isolate, R was the sum of the intensity of VC, LC, Vck and SP in the three replicas divided by three). A total index by host (TIH) was calculated multiplying R by a weight factor (WF) assigned by the relative economic significance of each host as: 1 for ML, 2 for SO, 3 for DG and 4 for MV. Finally, a cumulative score (C. Score) was compiled as the sum of the four TIH values (one for each indicator host) for each individual isolate or sub-isolate (C. Score). C. Score values were statistically compared by the Wald method ( $p < 0.05$ ) using CompaProWin\_2.0.1 software (CENSA, Mayabeque, Cuba).

### DAS-ELISA CTV detection

CTV infection was confirmed by DAS-ELISA following manufacturer's instructions (PlantPrint Diagnostics). Young leaves (1 g fresh weight) were collected from each plant and analyzed by two different antibody reagents: 3DF1 + 3CA5 MAb [mixture of monoclonal antibodies (MAb) that detects a wide range of CTV isolates; Cambra et al. 1990] and MCA13 MAb (MAb to selectively detect decline-inducing CTV isolates; Pemmar et al. 1990).

### Nucleic acid extraction and RT-PCR amplifications

Total RNA was extracted from midribs of young leaves (100 mg) of each ML plant inoculated with CTV isolates and sub-isolates using the procedure described by Arruabarrena et al. (2016). Complementary DNA (cDNA) was obtained in a final volume reaction of 20  $\mu$ L using 100 ng of random hexamer primers (Thermo), 100 U RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo), 10 U RiboLock RNase Inhibitor (Thermo) and 1 mM dNTPs, following the manufacturer's indications. To determine strain composition of CTV isolates and sub-isolates, the RNA silencing suppressor genes, p20 (561 bp), p25 (677 bp) and p23 (697 bp), were amplified by two step RT-PCR using the p20F/p20R,

p25F/p25R (Benítez-Galeano et al. 2015), and PM50/PM51 (Sambade et al. 2003) primer combinations, respectively.

PCR amplification was conducted in 25  $\mu$ L reactions containing 3  $\mu$ L of cDNA, 0.4  $\mu$ M of each primer, 1.25  $\mu$ M  $MgCl_2$ , 0.4  $\mu$ M dNTPs and 3 U *Taq* DNA polymerase (Thermo). PCR conditions were as follow: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 30 s at 94 °C, 45 s at 50 °C and 60 s at 72 °C, with a final extension step of 5 min at 72 °C. DNA amplicons were purified and resuspended in 20  $\mu$ L of nuclease-free water. Six sequence readings [four in forward (5'-3') and two in reverse (3'-5') directions] were obtained for each isolate or sub-isolate using the primers described above through MacroGen Inc. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)).

### Sequence comparisons and phylogenetic analysis

Nucleotide sequences were edited using BioEdit software (Hall 1999) and alignments were obtained with the Clustal W algorithm in MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). The evolutionary distance was measured by the number of nucleotides and amino acid changes between and within the different groups of isolates (defined as each isolate and its respective sub-isolates), as an indicator of evolutionary divergence. Analyses were conducted in MEGA 7.0 with default settings (Kumar et al. 2016). For the phylogenetic analyses, the model of nucleotide substitution that best fit the dataset (HKY85) was selected using the JModelTest program (Posada 2008) according to the Akaike Information Criterion (Akaike 1974). Maximum Likelihood (ML) phylogenetic trees were reconstructed with PhyML (Guindon and Gascuel 2003) using an online web server ([www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PHYML/interface.html](http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/PHYML/interface.html)) (Guindon et al. 2010). Branch support was estimated with the approximate likelihood-ratio test (aLRT) (Anisimova and Gascuel 2006). Based on the topology obtained for each phylogenetic tree, the sequenced genes of isolates or sub-isolates were assigned to one of the six following strains of CTV: VT, T3, NC, T30, T36 or RB (Harper 2013; Benítez-Galeano et al. 2015). It is not phylogenetically possible to define the T68 genotype based on the genomic regions considered in this work (Harper 2013). Reference sequences of each CTV strain were retrieved from GenBank (T36: AY340974, U16304; VT: U56902, EU937519, EU857538; T3: KC525952; RB: FJ525431, FJ525434; T68: JQ965169, EU076703; T30: AF260651, Y18420, and NC: GQ454870).

## Results

### Aphid transmission efficiency in SAT assays

CTV was first detected by DAS-ELISA using 3DF1 + 3CA5 MAb at 15 days post-inoculation (dpi) in ML receptor plants

inoculated with isolates I58 and DSST (Fig. 1a). Gradually, the virus was detected in an increasing number of receptor plants to a cumulative of 39 plants after 75 dpi, 31 of them also being reactive to MCA13 MAb. Overall, CTV transmission efficiency (TE) was 23.2% (39/168) according to DAS-ELISA using the 3DF1 + 3CA5 MAb. Depending on the source isolate used for inoculation and the MAb used for CTV detection, TE had a wide range of variation (Fig. 1b). Of the 39 3DF1 + 3CA5 reactive sub-isolates recovered from the 168 SAT attempts (28 for each CTV source), 14 were derived from I58, which represented a TE for this isolate of 50% (14 obtained sub-isolates / 28 attempts), 9 from SNH for a TE of 32.1% (9/28), 8 from DSST for a TE of 28.6% (8/28) and 4 from each SACH and TR7, for a TE of 14.3% (4/28). There was no SAT using the SAG4 isolate as inoculation source. Of the 31 CTV MCA13 reactive sub-isolates, the majority was obtained using I58 as inoculation source, which represented a TE of MCA13 reactive isolates of 42.9% (12/28), followed by SNH with 32.1% (9/28), DSST 25% (7/28), SACH 7.14% (2/28) and TR7 3.6% (1/28).

### Biological, serological and molecular characterization of isolates and sub-isolates

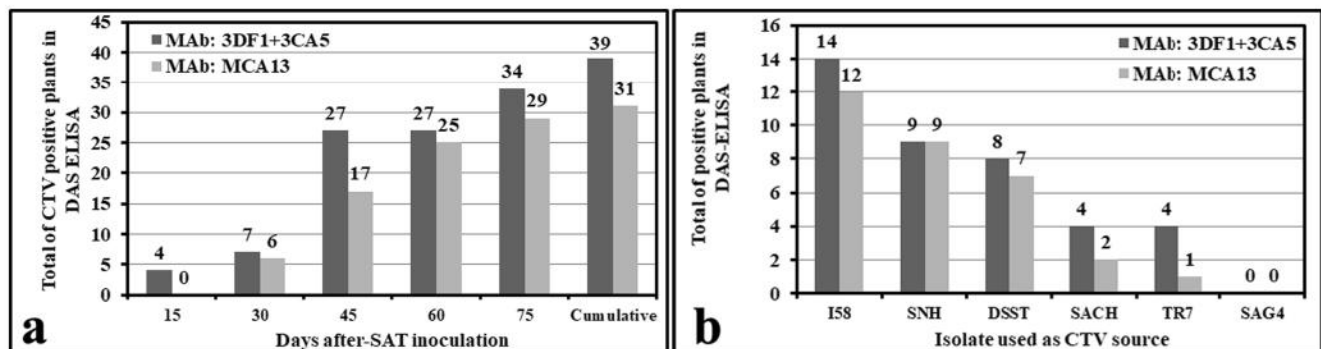
CTV source isolates used in the SAT assays were diverse in their serological, biological and molecular properties (Table 1). For the molecular characterization, sequences of 549, 621 and 672 nt were obtained for the p20, p23 and p25 genes, respectively, for most of the analyzed isolates and sub-isolates, and were deposited in GenBank with accession numbers MG983870 to MG983899 and KU928183 to KU928192 (p20), MG983841 to MG983869 and KU928173 to KU928182 (p23), and MG983900 to MG983926 and KU900349 to KU900357 (p25).

All the isolates used as CTV sources induced symptoms in ML, milder in plants graft-inoculated with TR7 and SNH than

SACH, SAG4, I58, and DSST (Table 1). The mildest symptoms were produced by SAG4 and TR7, whereas DSST, SACH, I58 and SNH symptom intensities ranged from moderate to severe in almost all the tested hosts. All plant sources of the six isolates, except TR7, reacted positively to the MCA13 MAb. Phylogenetic analysis of the CTV source isolates showed that only sequences of the p25 gene grouped into defined clusters (Table 1). Isolate DSST was the only one that could be characterized as NC, VT and NC by the p20, p23 and p25 gene sequences, respectively (Fig. 2). Another exception was the p20 region for I58 isolate that grouped into the VT cluster (Fig. 2a, Table 1).

The 39 CTV SAT-derived sub-isolates were assigned into three different groups according to the induction and intensity of symptoms in the different hosts (Table 1). Group 1 was composed of severe CTV sub-isolates (Table 1), inducing the strongest symptoms in the four hosts used in the bioindexing (Fig. 3c–j). Their cumulative scores ranged between 8.65 and 19.25 (Table 1), and all were MCA13 reactive. Strain composition in the group was T3, RB, NC and VT (Table 1). The sequence of the gene p20 from DSST-18 did not group with any of the CTV reference sequences used (Fig. 2b). Four out of 15 sub-isolates showed a monophyletic composition, *i.e.* sequences of the three genes of I58–1, I58–5, I58–11 and I58–26 grouped with the CTV VT strain. SNH-9 p20 and p25 sequences grouped with CTV RB, but the p23 sequence was not included in the RB clade, although it was placed closer to this grouping than to the other clades (Fig. 2).

Group 2 was composed of 14 sub-isolates that induced symptoms in three of the used hosts (except for SACH-6 and SNH-25) (Table 1), but milder than those from Group 1 (Fig. 3b, j). Their cumulative scores in the bioindexing varied between 2.75 and 7.25, and except for I58–27 and DSST-9, all were MCA13 reactive. Their strain compositions were mainly formed by a mixture of T3, VT, and NC (Table 1). The only sequence out of all the clades formed by the CTV strains was the p23 of SACH-28 (Fig. 2b). Four out the 14 obtained sub-



**Fig. 1** CTV infection in 168 ‘Mexican’ lime seedlings inoculated by single *Toxoptera citricida* transmission using six field isolates as CTV sources (28 plants for each CTV isolate source). **a** CTV infection at different days post-

SAT inoculation. **b** Cumulative CTV infection for different CTV inoculation sources. CTV was detected by DAS-ELISA using the mixture of monoclonal antibodies 3DF1 + 3CA5 and MCA13

**Table 1** Biological, serological and molecular characteristics of CTV isolates and sub-isolates obtained by single aphid transmission (SAT) assays

Group	Isolate or sub-isolate	DAS ELISA reactivity <sup>a</sup>		Biological indexing in indicator hosts <sup>b</sup>								C. Score <sup>c</sup>	Strain <sup>f</sup>			
				ML		SO		DG		MV			p20	p23	p25	
				3DF1+3CA5	MCA13	TIH <sup>c</sup>	SP <sup>d</sup>	TIH	SP	TIH	SP					TIH
CTV sources	SAG4	+	+	1	+	0	-	0	-	0	+	3.00	nd	nd	NC	
	TR7	+	-	0.5	+	3	-	0	-	0	-	4.50	nd	nd	NC	
	SACH	+	+	1.25	+	2	-	6	+	12	+	21.25	nd	nd	NC	
	SNH	+	+	0.5	+	1	-	1.5	+	0	-	5.00	nd	nd	NC	
	I58	+	+	1	+	0	-	3	+	2	+	10.00	VT	nd	NC	
Sub-isolates group I	DSST	+	+	1	+	1	-	3	+	0	-	8.00	NC	VT	NC	
	I58-23	+	+	2.75	+	3	-	7.5	+	6	-	19.25a	T3	VT	NC	
	I58-1	+	+	3	+	3	-	6.75	+	6	+	18.75a	VT	VT	VT	
	I58-26	+	+	2.25	+	3	-	7.5	+	2	-	14.75a	VT	VT	VT	
	I58-12	+	+	1.75	+	3	-	7.5	+	2	-	14.25a	NC	VT	ns	
	SNH-9	+	+	1.25	+	3	-	3	+	6	-	13.25a	RB	nd	RB	
	I58-5	+	+	1.75	+	3	-	6	+	2	+	12.75a	VT	VT	VT	
	I58-11	+	+	1	+	2	-	7.5	+	2	-	12.50a	VT	VT	VT	
	I58-9	+	+	1.25	+	2	-	4.5	+	4	-	11.75a	NC	ns	NC	
	I58-25	+	+	2.25	+	5	+	2.25	-	2	-	11.50a	T3	VT	NC	
	I58-24	+	+	0.75	-	4	+	6	+	0	-	10.75a	NC	VT	NC	
	DSST-14	+	+	1.5	-	1	-	6	+	2	+	10.50a	NC	VT	NC	
	SNH-18	+	+	1	-	3	-	1.8	-	4.2	-	10.00a	NC	T3	NC	
	SNH-19	+	+	1.5	+	dp	dp	6	+	2.2	-	9.70a	T3	T3	NC	
	DSST-18	+	+	1.6	+	1	-	4.5	+	2	+	9.10a	nd	T3	NC	
	SNH-22	+	+	1.7	+	2.5	-	0.45	+	4	-	8.65ab	T3	T3	RB	
	Sub-isolates group II	I58-10	+	+	1.75	+	1	-	4.5	+	0	-	7.25b	T3	T3	NC
		DSST-13	+	+	2	+	3	-	1.5	+	0	-	6.50b	NC	VT	NC
I58-22		+	+	1.75	+	2	-	0	-	2	+	5.75b	T3	T3	T3	
SACH-6		+	+	1.5	+	1.7	-	0.45	-	2	-	5.65b	T3	T3	T3	
DSST-6		+	+	1	-	3	-	1.5	+	0	-	5.50b	VT	VT	NC	
SNH-25		+	+	1	-	1	-	1.5	+	2	-	5.50b	NC	VT	NC	
DSST-25		+	+	2	+	3	-	0	-	0	-	5.00b	NC	NC	NC	
SACH-28		+	+	1	-	4	+	0	-	0	-	5.00b	T3	nd	T3	
SNH-2		+	+	0.25	-	2	-	0	-	2	-	4.25b	NC	VT	NC	
DSST-17		+	+	1	-	1	-	0	-	2	+	4.00b	NC	NC	ns	
SNH-16		+	+	1.5	+	2	-	0	-	0	-	3.50b	VT	VT	ns	
I58-27		+	-	2	+	1	-	0	-	0	-	3.00b	ns	ns	ns	
SNH-11		+	+	0.33	-	2.5	-	0	-	0	-	2.83b	VT	VT	VT	
DSST-9		+	-	0.25	-	1	-	1.5	+	0	-	2.75bc	T3	VT	NC	
Sub-isolates group III	DSST-1	+	+	0.5	-	2	-	0	-	0	-	2.50c	NC	T3	NC	
	TR7-23	+	-	0.25	-	2	-	0	-	0	-	2.25c	VT	VT	VT	
	TR7-25	+	+	0.25	-	0.7	-	1.05	-	0	-	2.00c	VT	VT	VT	
	SACH-9	+	-	0.2	-	1.7	-	0	-	0	-	1.90c	T3	T3	ns	
	SACH-7	+	-	0.25	-	1	-	0	-	0	-	1.25c	ns	ns	ns	
	SNH-7	+	+	0.25	-	1	-	0	-	0	-	1.25c	VT	VT	VT	
	TR7-18	+	-	0.25	-	0.7	-	0	-	0	-	0.95c	VT	VT	VT	
	I58-7	+	-	0.5	-	0	-	0	-	0	-	0.50c	ns	ns	ns	
TR7-3	+	-	0.3	-	0	-	0	-	0	-	0.30c	ns	ns	ns		

<sup>a</sup> Determined in the 'Mexican' lime (ML) receptor of each isolate or sub-isolate. + positive, - negative

<sup>b</sup> Three seedlings were used per test. ML, 'Mexican' lime; SO, sour orange; DG, 'Duncan' grapefruit; MV, 'Madame Vinous' sweet orange. Each plant was rated by symptom intensity as 0 = asymptomatic, 1 = mild, 2 = moderate, and 3 = severe

<sup>c</sup> Total index by host (TIH) was determined as the average of all symptoms in the three plants of each host inoculated with each isolate or sub-isolate (visual symptoms plus SP intensity, R), multiplied by a weight factor (WF) assigned by the relative economic significance of each host as 1 for ML, 2 for SO, 3 for DG and 4 for MV. dp: dead plant

<sup>d</sup> SP reaction showed as positive (+) or negative (-) was used as a factor to separate groups

<sup>e</sup> C. Score was the sum of the TIH value obtained for each host. In sub-isolates values, means followed by the same lowercase letter indicate no significant differences based on the Wald method test ( $p < 0.05$ )

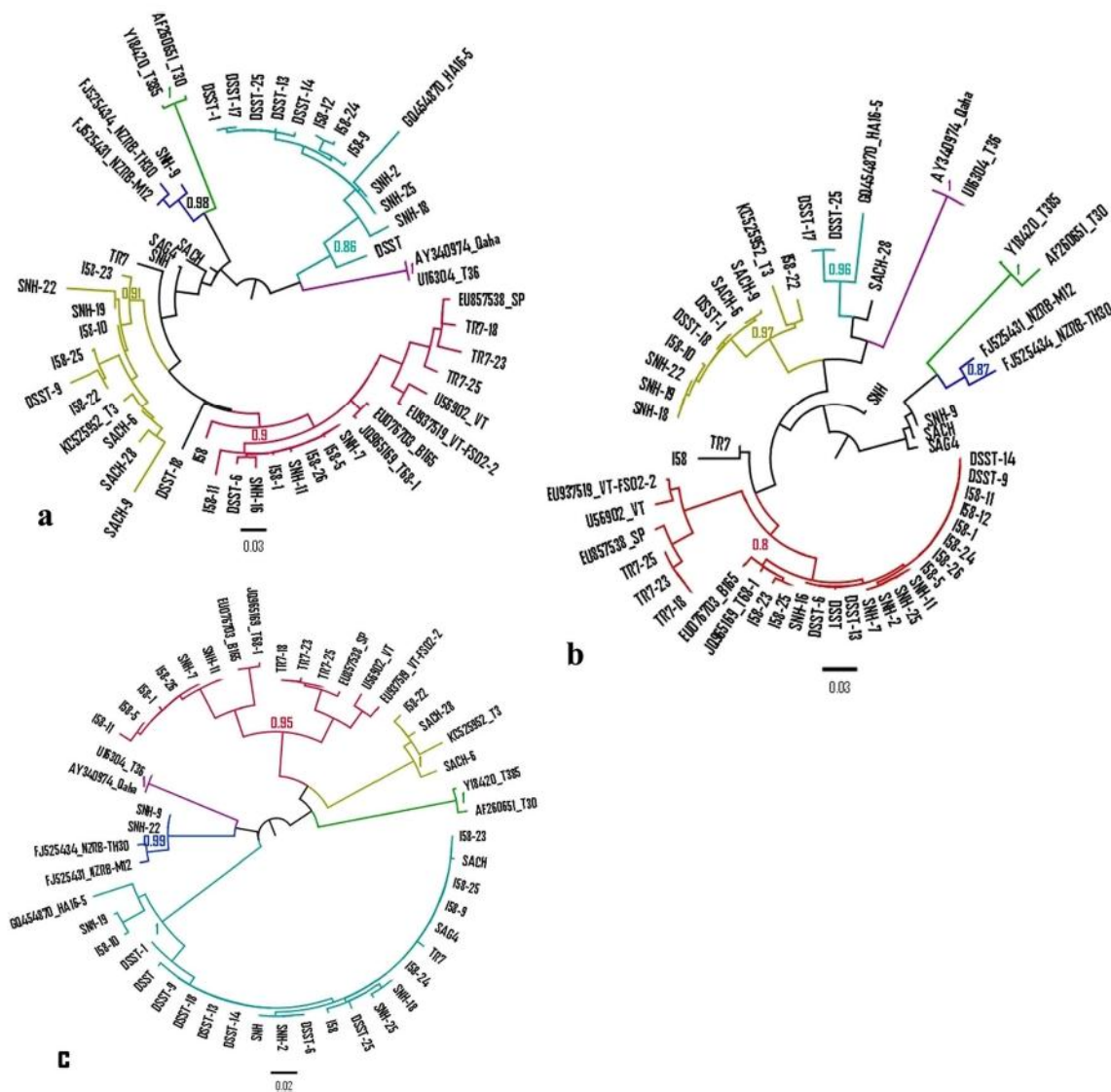
<sup>f</sup> Sequencing and phylogenetic analysis of the RT-PCR product for each gene of each sub-isolate. ns: Not sequenced. nd: strain not determined

isolates had the three genes phylogenetically assigned to the same strain (Table 1). SACH-6 and I58–22 were assigned to the T3 strain, SNH-11 to VT, and DSST-25 to NC (Table 1).

Group 3 was composed of nine sub-isolates with cumulative scores rating between 0.3 and 2.5 (Table 1), induced mild or moderate symptoms only in ML and SO (Fig. 3a), except for TR7–25 that additionally caused mild symptoms in DG (Table 1). Among these isolates, six were MCA13 non-reactive (TR7–3, TR7–18, TR7–23, SACH-7, SACH-9 and I58–7). TR7–18, TR7–23, TR7–25 and SNH-7 sequences of p20, p23 and p25 grouped in the VT clade (Fig. 2). DSST-1 and SACH-9 showed diverse strains in their composition (Table 1).

### Separation of CTV variants and strains after SAT assays

CTV population segregation was observed in the sub-isolates by the differences in biological, serological and molecular composition when compared to their corresponding original CTV inoculation sources (Table 1). For instance, in the comparison among I58 isolate and its derived sub-isolates, I58–7 belonging to group 1 (Table 1) induced mild symptoms only in ML, whereas I58–10, I58–22 and I58–27 were assigned to group 2 producing moderate symptoms in three out of the four evaluated hosts (Table 1). Conversely, I58 and its sub-isolates I58–1, I58–5, I58–9, I58–11, I58–12, I58–23, I58–24, I58–25 and I58–26 (Table 1) showed the most intense symptoms. I58



**Fig. 2** Phylogenetic relationships of CTV isolates and sub-isolates characterized in this study with reference sequences of the seven CTV strains represented as colored branches: T30 (green), RB (blue), T36 (violet), VT (red), T3 (yellow) and NC (turquoise) using the genes p20 (A), p23 (B) and p25 (C). Principal node aLRT values are indicated.

Accession number for the CTV isolates and sub-isolates are: p20, MG983870 to MG983899 and KU928183 to KU928192; p23, MG983841 to MG983869 and KU928173 to KU928182; p25, MG983900 to MG983926 and KU900349 to KU900357



**Fig. 3** Representative symptoms induced by some of the sub-isolates obtained after SAT inoculation. **a, b, c** Mild, moderate and severe vein clearing (VC) induced in ML by TR7-3, SACH-6 and I58-1, respectively. **d, e** Severe vein corking (Vco) and leaf cupping (LC) induced by I58-1 sub-isolate in ML. **f, g** Seedling yellow reaction

induced by I58-23 in sour orange (F, severe chlorosis, shortened leaves; G, stunting). **h, i** Seedling yellow reaction induced by I58-23 in 'Duncan' grapefruit (H, severe chlorosis, shortened leaves; I, stunting). **j** Stem pitting with intensity 0 (induced by SACH-9), 1 (DSST-17), 2 (SNH-2) and 3 (I58-1)

isolate and most of its SAT-derived sub-isolates (Table 1) were MCA13 reactive, but I58-7 and I58-27 sub-isolates did not react to this MAb. Sub-isolates derived from SNH, DSST and SACH isolates exhibited a similar segregation as shown in Table 1. A minor diversity was observed when TR7 was used as CTV source. TR7 and its three derived sub-isolates (TR7-23, TR7-18 and TR7-3) did not react to the MCA13 MAb, while TR7-25 reacted positively. Besides, none of them induced symptoms or induced only mild symptoms in the infected hosts.

An estimation of the evolutionary distance of each isolate and its derived sub-isolates was calculated (Table 2) and compared to a hypothetical group composed by isolates of different CTV strains. The values at the nucleotide level were similar among groups for the three analyzed genes, although in the p20 sequences values were slightly higher than in p23 and p25 for each group. Values at the nucleotide level ranged from 0 for DSST group in p25 to 0.07 for SNH group in p20. As expected, the evolutionary diversity at the amino acid level was lower for every gene compared to the nucleotide value,

ranging from 0 to 0.06. The exception was the p23 sequence for which both values were similar (*i.e.* nucleotide and amino acid identity), depicting no variation between nucleotide and amino acid sequences. Groups as those formed by SNH and SACH isolates and sub-isolates showed high *d* values for the three analyzed genes, almost as high as the reference sequence group *d* values (Table 2, Ref. Seq.).

When comparing the divergence among groups, all the *d* values found (Table 3) were as high as the *d* value obtained when isolates in the reference sequence group were compared (Table 2, Ref. Seq.). The highest values were obtained when the DSST group was compared to the others at the nucleotide level of the p20 gene. Meanwhile, at the amino acid level of the p20 gene, the highest values of evolutionary distance were found between group TR7 and the other groups. For p23 and p25 genes, distance values were similar between groups both at the nucleotide and amino acid levels, representing more variation at the nucleotide sequence.

After SAT assays, 30.8% (12/39) of the sub-isolates had the three characterized genes (p20, p23 and p25) composed by only one of the six CTV strains (Table 1). VT (SNH-11, SNH-7, I58-1, I58-5, I58-11, I58-26, TR7-18, TR7-23 and TR7-25) was the prevalent strain (9/14). T3 strain was determined in the three analyzed genes from sub-isolates SACH-6 and I58-22. Sub-isolate DSST-25 had the three genes assigned to NC. The remaining 17 sub-isolates were composed of different CTV strains according to each analyzed gene, with VT, NC and T3 being the most frequently detected.

The analysis of the SNH sub-isolates genetic composition revealed a mixture of RB, T3, NC and VT strains. The I58 isolate harbored genes of T3, VT and NC in its composition, DSST was composed by a mixture of NC, T3 and VT, and SACH had T3 and NC genes. According to these results, only the TR7 isolate showed to be composed by strains VT and NC and its three sub-isolates were molecularly characterized as VT. Interestingly, four out of nine VT sub-isolates induced the mildest symptoms, and only in ML (TR7-18, TR7-23, TR7-25 and SNH-7), with TR7-18 and TR7-23 being non-reactive to MCA13. SACH-9, classified as a T3 strain according to the p20 and p23 genes, also induced mild symptoms and was MCA13 non-reactive.

## Discussion

CTV isolates in field trees are often composed of variable populations of multiple strains that may enhance changes in the population genetic diversity, leading to the generation of new viral variants due to recombination events, or complementation among different strains (Brlansky et al. 2003; Folimonova 2013; Harper et al. 2015b). In Uruguay, CTV severe SP isolates are widespread (Benítez-Galeano et al. 2015; Rubio et al. 2019) and a high genetic diversity in field

populations has been reported (Benítez-Galeano et al. 2015). The study of CTV strain circulation could provide important information to understand disease development and implement management strategies in the country.

CTV transmission by aphids has been reported as highly variable (Calavan et al. 1980; Roistacher et al. 1980), and there is a trend towards a higher transmissibility of severe CTV isolates (Yokomi et al. 2010; Zhou et al. 2011). CTV isolates could be clustered into three groups according to their transmission rate: low (0–5%), intermediate (6–15%) and high (over 16%) (Yokomi et al. 2010). According to this classification, of the six Uruguayan field isolates, I58 (50%), SNH (32.1%) and DSST (28.6%) showed a high aphid transmissibility. In the biological characterization, these isolates displayed high cumulative score, evidence of the severe reaction induced in the evaluated hosts and in agreement with their high aphid transmissibility. TR7 showed intermediate aphid transmissibility, in accordance with the mild symptoms induced in the biological assay. However, SACH showed intermediate aphid transmissibility, but reached the highest cumulative score among the six isolates used as CTV sources. Previous studies performed by Zhou et al. (2011) showed lack of statistically significant differences in SAT rates between some severe and mild isolates. It should be noted that CTV vector transmission is also greatly influenced by other factors such as temperature and host cultivar (Bar-Joseph and Loebenstein 1973; Yokomi et al. 2010).

The presence of the RB strain in the CTV isolates circulating in the country is an important risk for Uruguay, a country where trifoliolate rootstocks are widely used. SNH-9, previously characterized as RB strain by Hernández-Rodríguez et al. (2017), induced severe symptoms in the four hosts evaluated during our study. RB isolates from New Zealand induced no symptoms on lemon, grapefruit, sweet and sour oranges, and only very mild vein clearing was observed on ML (Scott Harper, personal communication). Similarly, in California, three CTV RB isolates induced mild symptoms compared with severe isolates in greenhouse biological indexing (Yokomi et al. 2017).

At present, protection of commercial citrus varieties from severe CTV isolates causing stem pitting has only been achieved in Brazil, Australia, South Africa, Peru, Argentina and Japan using cross-protection (Roistacher et al. 2010; Folimonova 2013). Finding mild protecting CTV isolates with homologous genotypes to the severe ones that need to be controlled is an important challenge to accomplish in a long-term CTV cross-protection system (Folimonova 2013). A first attempt to identify mild CTV isolates from a collection of Uruguayan field isolates failed due to the high intensity of the symptoms induced (Rubio et al. 2019). In our study, SAT allowed us to segregate TR7-3, TR7-18, TR7-23, SACH-7, SACH-9, I58-7, I58-27 and DSST-9 sub-isolates, which resulted in MCA13 non-reactive, mild CTV isolates.

**Table 2** Estimates of evolutionary divergence (d) within groups of CTV isolates and their derived sub-isolates

Group <sup>a</sup>	Gene		p23		p20	
	p25		nt	aa	nt	aa
	nt	aa				
DSST	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
I58	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.04 ± 0.01
SACH	0.06 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
SNH	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01
TR7	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Ref. seq. <sup>b</sup>	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.05 ± 0.01

<sup>a</sup> Each group is composed by the isolate (CTV source) and its sub-isolates obtained through SAT.

<sup>b</sup> Ref. seq. is a hypothetical group composed by isolates of the different extant CTV strains used only for comparative purposes (T36: AY340974, U16304; VT: U56902, EU937519, EU857538; T3: KC525952; RB: FJ525431, FJ525434; T68: JQ965169, EU076703; T30: AF260651, Y18420; NC: GQ454870)

These sub-isolates may be promising candidates to be evaluated in a cross-protection challenge program against severe isolates of the VT strain, while SACH-9 could be selected against the genotype T3.

However, further characterization of the complete genome of some of the obtained sub-isolates is needed for assigning isolates into a given CTV strain. In our study, p20 and p23 genes of DSST-17 showed to be NC, but a recent report based on the complete genome revealed its recombinant nature grouping with the RB strain (Benítez-Galeano et al. 2018). The accurate diagnosis of CTV strain type requires the amplification and sequencing of the complete genome (Harper 2013).

Sub-isolates obtained by SAT from the six Uruguayan field isolates exhibited remarkable differences in their biological indexing response, serological reaction to MCA13 monoclonal

antibody, and genetic diversity in the p20, p23 and p25 genes. Segregation through SAT evidenced the heterogeneity of the CTV populations in Uruguay in at least three out of the six isolates evaluated (I58, DSST and SNH). Single aphid transmission (SAT) used in this study to separate the population complexes in the characterized CTV field isolate has shown to be a useful tool to segregate CTV populations from complex mixtures (Broadbent et al. 1996; Ayllón et al. 1999).

Direct sequencing of the p20, p23 and p25 genes from the CTV isolates and their SAT derived sub-isolates used in this study showed a high inter- and intra-group genetic diversity, in some cases closer to the comparisons among reference sequences of the seven CTV strains. Phylogenetic analyses showed the presence of the extant strains VT, T3, NC, and RB in the majority of the genotype composition of the isolates

**Table 3** Estimates of nucleotide (italic) and amino acid (bold) evolutionary divergences (d) between isolates and their derived sub-isolate groups

Gene	Group <sup>a</sup>	DSST	I58	SACH	SNH	TR7
<b>p20</b>	DSST		<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>	<b>0.05 ± 0.01</b>	<b>0.08 ± 0.02</b>
	I58	<i>0.08 ± 0.01<sup>b</sup></i>		<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>
	SACH	<i>0.09 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>		<b>0.05 ± 0.01</b>	<b>0.07 ± 0.01</b>
	SNH	<i>0.08 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.07 ± 0.01</i>		<b>0.07 ± 0.01</b>
	TR7	<i>0.10 ± 0.01</i>	<i>0.07 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.08 ± 0.01</i>	
<b>p23</b>	DSST		<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>	<b>0.04 ± 0.01</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>
	I58	<i>0.04 ± 0.01</i>		<b>0.05 ± 0.01</b>	<b>0.03 ± 0.01</b>	<b>0.06 ± 0.01</b>
	SACH	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>		<b>0.05 ± 0.01</b>	<b>0.07 ± 0.02</b>
	SNH	<i>0.04 ± 0.01</i>	<i>0.04 ± 0.01</i>	<i>0.05 ± 0.01</i>		<b>0.06 ± 0.01</b>
	TR7	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.05 ± 0.01</i>	<i>0.07 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	
<b>p25</b>	DSST		<b>0.02 ± 0.01</b>	<b>0.01 ± 0.01</b>	<b>0.02 ± 0.01</b>	<b>0.03 ± 0.01</b>
	I58	<i>0.04 ± 0.01</i>		<b>0.02 ± 0.01</b>	<b>0.03 ± 0.01</b>	<b>0.02 ± 0.01</b>
	SACH	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>		<b>0.02 ± 0.01</b>	<b>0.03 ± 0.01</b>
	SNH	<i>0.04 ± 0.01</i>	<i>0.05 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>		<b>0.04 ± 0.01</b>
	TR7	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	<i>0.06 ± 0.01</i>	

<sup>a</sup> Each group is composed by the isolate (CTV source) and its sub-isolates obtained through SAT.

and derived sub-isolates, as previously described (Benítez-Galeano et al. 2015; Rubio et al. 2019).

Our results represent the first attempt to study with a molecular and biological approach the individual components of field CTV Uruguayan isolates separating them by SAT, and revealed the presence of biological and genetic diverse viral complexes in CTV field populations in Uruguay. Sub-isolates with VT genotype, therefore inducing severe phenotypes, were the most frequently obtained in the SAT assays, suggesting that this strain could be the prevalent one in the field. The RB strain can be transmitted after single aphid transmission from a source containing at least three more CTV strains (VT, NC and T3). Moreover, this work showed that Uruguayan RB isolates can induce more intense symptoms when compared with RB isolates from other countries, raising the needs of studying its interaction with trifoliolate rootstocks. Such complexity in CTV populations is an important issue due to the potential natural segregation that aphids drive under field conditions, which could separate new isolates causing an outbreak of tristeza disease in our conditions.

**Acknowledgments** This research was funded by the Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay (project CT-06), through the National Program of Citrus Research and the National Citrus Sanitation Program.

## References

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19:716–723
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Systematic Biology* 55:539–552
- Arruabarrena A, Benítez-Galeano MJ, Giambiasi M, Bertalmío A, Colina R, Hernández-Rodríguez L (2016) Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *Journal of Virological Methods* 237:14–17
- Ayllón MA, Rubio L, Moya A, Guerri JA, Moreno P (1999) The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. *Virology* 255:32–39
- 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
- Bar-Joseph M, Marcus R, Lee RF (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27:291–316
- Benítez-Galeano MJ, 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 MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G, Colina R (2018) Complete genome sequence of a novel recombinant citrus tristeza virus, a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announcements* 6:e00442–e00418
- Brlansky RH, Damsteegt VD, Howd DS, Roy A (2003) Molecular analyses of citrus tristeza virus subisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* 87:397–401
- Broadbent P, Bransky RH, Indsto J (1996) Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmission. *Plant Disease* 80:329–333
- Calavan EC, Harjung MK, Blue RL, Roistacher CN, Gumpf DJ, Moore PW (1980) Natural spread of seedling yellows and sweet orange and grapefruit stem pitting tristeza viruses at the University of California, Riverside. In: *Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, Riverside, pp 69–75
- Cambra M, Garnsey SM, Permar TA, Henderson CT, Gumpf DJ, Vela C (1990) Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* 80:103
- Dawson WO, Bar-Joseph M, Garnsey SM, Moreno P (2015) Citrus tristeza virus: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology* 53:137–155
- Folimonova S (2013) Developing an understanding of cross-protection by citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology* 4:76
- Garnsey SM, Gumpf DJ, Roistacher CN, Civerolo EL, Lee RF, Yokomi RK, Bar-Joseph M (1987) Toward a standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151–157
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52:696–704
- Guindon S, Dufayard J, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: 3.0. *Systematic Biology* 59:307–321
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98
- Harper SJ (2013) Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology* 4:93
- Harper SJ, Cowell SJ, Dawson WO (2015a) Finding balance: virus populations reach equilibrium during the infection process. *Virology* 485:205–212
- Harper SJ, Cowell SJ, Dawson WO (2015b) With a little help from my friends: complementation as a survival strategy for viruses in a long-lived host system. *Virology* 478:123–128
- Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Arruabarrena A, Rubio L, Rivas F, Benítez-Galeano MJ, Colina R, Maeso D (2017) First report of the citrus tristeza virus trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in 'Newhall' sweet orange in South America. *Plant Disease* 101:1
- Koch de Brotos L, Boasso C (1955) Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Ministerio de Ganadería y Agricultura, Montevideo
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870–1874
- Lin Y, Bransky RH, Powell CA (2002) Inefficient transmission of citrus tristeza virus from grapefruit by single brown citrus aphids. *Hortscience* 37:936–939
- Moreno P, Ambros S, Albiach-Martí MR, Guerri J, Peña L (2008) Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9:251–268
- Permar TA, Garnsey SM, Gumpf DJ, Lee RT (1990) A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224–228
- Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25:1253–1256
- Roistacher CN (1991) Graft-transmissible diseases of *Citrus*. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome
- Roistacher CN, Nauer EM, Kishaba A, Calavan EC (1980) Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. In: *Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV, Riverside, pp 76–82



- Roistacher CN, da Graça JV, Müller GW (2010) Cross protection against citrus tristeza virus - a review. In: Hilf ME, Timmer LW, Milne RG, da Graça JV (Eds.) Proceeding of the 17<sup>th</sup> Conference of the International Organization of Citrus Virology. IOCV, Riverside. pp. 1–27
- Roy A, Brlansky RH (2009) Population dynamics of a Florida citrus tristeza virus isolate and aphid-transmitted sub-isolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99:1297–1306
- Rubio L, Bertalmio A, Hernández-Rodríguez L, Benítez Galeano MJ, Arruabarrena A, Rivas F, Colina R, Maeso D (2019) Biological and molecular characterization of Uruguayan citrus tristeza virus field isolates. *Journal of Plant Pathology* 101:97–105
- Sambade A, López C, Rubio L, Flores R, Gueri 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
- Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (2000) Compendium of citrus diseases. APS Press, St Paul
- Yokomi RK, Polek M, Gumpf DJ (2010) Transmission and spread of citrus tristeza virus in central California. In: Karasev AV, Hilf ME (Eds). *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*. APS Press, St. Paul. pp. 151–165
- Yokomi RK, Selvaraj V, Maheshwari Y, Saponari M, Giampetruzzi A, Chiumenti M, Hajeri S (2017) Identification and characterization of citrus tristeza virus isolates breaking resistance in trifoliolate orange in California. *Phytopathology* 107:901–908
- Zhou CY, Wang XF, Liu YQ, Liu KH, Zou Q, Xiang Y, Li ZA (2011) Influence of the quantity and variability of citrus tristeza virus on transmissibility by single *Toxoptera citricida*. *Journal of Plant Pathology* 93:97–103

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### **3.2. Benítez-Galeano *et al.* 2018\_ Complete genome sequence of a novel recombinant CTV: a RB isolate from Uruguay**

En este trabajo se reportó la secuencia completa del genoma de CTV del subaislado DSST-17 obtenido mediante transmisión por un solo áfido. El genoma se obtuvo mediante la combinación de la tecnología de secuenciación masiva Illumina y secuenciación de Sanger. La estructura del genoma resultó ser recombinante entre los genotipos T36, HA16-5 y RB. Mediante análisis filogenético se estableció que el genoma pertenece al genotipo RB (Resistance-Breaking). Este genotipo es de gran importancia en Uruguay ya que afecta cultivos injertados en trifolia y sus híbridos, como lo son los pies del 90% de las plantaciones del país.

Aquí se abordaron los objetivos específicos 3.1.3. y 3.1.5.

Los resultados se publicaron en la revista *Genome Announcement*: Benítez-Galeano MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G & Colina R. 2018. Complete genome sequence of a novel recombinant CTV: a RB isolate from Uruguay. *Genome Announc* 6:e00442-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00442-18>



# Complete Genome Sequence of a Novel Recombinant *Citrus Tristeza Virus*, a Resistance-Breaking Isolate from Uruguay

María José Benítez-Galeano,<sup>a</sup> Thomas Vallet,<sup>b</sup> Lucía Carrau,<sup>b</sup> Lester Hernández-Rodríguez,<sup>c</sup> Ana Bertalmío,<sup>c</sup> Fernando Rivas,<sup>c</sup> Leticia Rubio,<sup>c</sup> Diego Maeso,<sup>c</sup>  Marco Vignuzzi,<sup>b</sup> Gonzalo Moratorio,<sup>b</sup>  Rodney Colina<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Virology, University of the Republic, Salto, Uruguay

<sup>b</sup>Institut Pasteur, Viral Populations and Pathogenesis, Centre National de la Recherche Scientifique UMR 3569, Paris, France

<sup>c</sup>National Institute of Agricultural Research, Salto, Uruguay

**ABSTRACT** We report here the complete genome sequence of a *Citrus tristeza virus* (CTV) from Uruguay, sequenced by using Illumina and Sanger sequencing technology. This CTV DSST-17 genome clustered within genotype resistance breaking (RB) and presents two recombination events.

**C**itrus crops are among the most important commercial fruit crops worldwide. *Citrus tristeza virus* (CTV) (*Closterovirus*, *Closteroviridae*) is one of the most destructive pathogens that affects citrus trees around the world and has been responsible for the loss of over 100 million trees in the past 70 years (1). Depending on the viral strain and on the species or scion-rootstock combination, CTV may cause three distinct host reactions, named seedling yellows, quick decline, and stem pitting, of which the last two are significant problems for citrus cultivation (2).

The CTV genome, the largest plant virus reported so far, is a single-stranded positive-sense RNA molecule of approximately 19.3 kb in length, containing 12 open reading frames (ORFs) that encode at least 19 proteins (3). Genetic studies of different strains of CTV revealed the existence of seven distinct genetic lineages or genotypes worldwide, known as VT, T3, T30, T36, T68, resistance breaking (RB), and NC (4, 5). The RB genotype, described for the first time in New Zealand by Dawson and Mooney, is the only CTV-infecting genotype capable of overcoming the trifoliolate-rootstock resistance due to the ability of replication and systemic movement throughout *Poncirus trifoliata* (6). Last year, Hernández-Rodríguez and coworkers reported a New Hall sweet orange tree infected with the CTV-RB genotype in Uruguay, but only partial sequences were available (7).

In the present study, subisolate DSST-17, obtained by single aphid transmission from a field sample collected in 2014 in Salto, Uruguay, from a Navelina sweet orange, was subjected to Illumina sequencing technology. Total RNA was extracted using the RNeasy plant minikit (Qiagen) and submitted to RNA library preparation with a NEBNext Ultra II RNA library prep kit (Illumina). The library was sequenced using the NextSeq 500 system platform (Illumina). Reads were trimmed (quality limit 0.02; Phred score  $\geq$  30) and assembled with CLC Genomics Workbench version 11. After trimming, reads with an average length of 150 nucleotides (nt) were used to generate through *de novo* assembly a long contig of 19,269 nt. The complete genome obtained was compared with all available full genomes of the GenBank database using MEGA 6 (8). Phylogenetic analysis grouped the DSST-17 isolate within the RB genotype with a genome nucleotide identity ranging from 94.1% to 99.6%. Strikingly, the highest similarity was with isolate B390-5 (GenBank accession number KU883265) from South Africa, which has weather conditions similar to those of Uruguay. A recombination analysis using the Recombi-

Received 19 April 2018 Accepted 24 April 2018 Published 31 May 2018

**Citation** Benítez-Galeano MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G, Colina R. 2018. Complete genome sequence of a novel recombinant *Citrus tristeza virus*, a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announc* 6:e00442-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00442-18>.

**Copyright** © 2018 Benítez-Galeano et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Rodney Colina, [rodneycolina1@gmail.com](mailto:rodneycolina1@gmail.com).

© 2018 Benítez-Galeano et al. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

(9, 10). The analysis revealed that isolate DSST-17 is a recombinant genome with at least two recombination events. For the first recombinant region, a T36-like fragment goes from positions 1 to 3616. The second event seems to be with an NC-like isolate (HA16-5) from base 14586 to the end of the genome. In addition, PCR amplification and Sanger sequencing were performed to confirm these recombination events. As far as we know, this is the first report from South America of a complete genome of CTV belonging to the RB genotype.

**Accession number(s).** The genomic sequence for isolate CTV DSST-17 was deposited in GenBank under accession number [MH186146](#).

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stephanie Beaucourt for invaluable technical advice.

This work was funded by the National Institute of Agricultural Research from Uruguay (INIA-FPTA-310). M.J.B.-G. received a travel scholarship from the University of the Republic, Uruguay (PEDECIBA and CSIC), for an internship at the Institut Pasteur and is the recipient of a PhD scholarship from the Academic Postgraduate Commission, University of the Republic, Uruguay.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### REFERENCES

1. Roistacher CN, da Graça JV, Müller GW. 2010. Cross protection against Citrus tristeza virus—a review, p 1–27. In Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, (ed), Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA.
2. Moreno P, Ambrós S, Albiach-Martí M, Guerri J, Peña L. 2008. *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Mol Plant Pathol 9:251–268. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>.
3. Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM, Lewandowski DJ, Dawson WO. 1995. Complete sequence of the Citrus tristeza virus RNA genome. Virology 208:511–520. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>.
4. Harper SJ. 2013. *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. Front Microbiol 4:1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>.
5. Benítez-Galeano MJ, 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. <https://doi.org/10.3390/v7072814>.
6. Dawson TE, Mooney PA. 2000. Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of Citrus tristeza virus in New Zealand, p 69–76. In Yokomi RK, Lee RF, Da Graça JV (ed), Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA.
7. Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Arruabarrena A, Rubio L, Rivas F, Benítez-Galeano MJ, Colina R, Maeso D. 2017. First report of the *Citrus tristeza virus trifoliolate* resistance-breaking (RB) genotype in 'Newhall' sweet orange in South America. Plant Dis 101:1063. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0430-PDN>.
8. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
9. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. 2015. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. Virus Evol 1:vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>.
10. Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. 1999. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. J Virol 73:152–160.

### 3.3. Benítez-Galeano *et al.* Caracterización biológica, molecular y evolutiva de subaislados de CTV obtenidos mediante transmisión por único áfido (Manuscrito en preparación)

#### 1. Introducción

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) es el patógeno viral más severo que afecta cítricos, y ha sido responsable de la pérdida de más de 100 millones de árboles en los últimos 80 años (Moreno *et al.*, 2008). El virus es transmitido de manera semi persistente por áfidos de los géneros *Toxoptera* y *Aphis*, siendo la especie *T. citricida* (Kirkaldy) la más eficiente (Brlansky *et al.*, 2003). También es transmitido por injerto y herramientas de corte infectadas, y se limita a infectar células del floema de especies de plantas de la familia *Rutaceae* (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Los viriones de CTV (*Closteroviridae*, *Closterovirus*) son filamentos helicoidales de 2000 x 11 nm, con una nucleocápside compuesta por las proteínas p25 y p27 que cubren el 95% y 5% del genoma, respectivamente (Ayllón *et al.*, 2001). El genoma de RNA simple cadena de polaridad positiva contiene 12 ORFs distribuidos en 19.3 kb, que codifican al menos 17 productos proteicos (Febres *et al.*, 1996; Agranovsky, 1996). La mitad 5' del genoma, que codifica componentes del complejo replicasa, es traducida directamente del RNA genómico, mientras que los ORFs restantes son expresados mediante 10 RNAs sub genómicos (sgRNAs) 3' co-terminales, que difieren en su acumulación y aparición en el tiempo durante el proceso de infección (Hilf *et al.*, 1995; Navas-Castillo *et al.*, 1997). El ORF 1 expresa una gran poliproteína (ORF1a), así como la RNA polimerasa RNA dependiente (ORF1b, RdRp) mediante un *frameshift* +1 (Karasev *et al.*, 1995). Los ORFs de la mitad 3' codifican las proteínas de cápside (p25 y p27), tres supresores del silenciamiento por RNA interferencia (p25, p20 y p23), dos genes que expresan un homólogo de una proteína de choque térmico (p65) y una proteína con un motivo divergente de proteína de cápside, ambas necesarias para el ensamblaje del virión, y tres proteínas vinculadas con el rango de hospedero (p33, p13 y p18) (Satyanarayana *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2004, Tatineni *et al.*, 2011). A su vez, p20 se acumula en cuerpos

de inclusión amorfos y p23, una proteína de unión al RNA, controla la acumulación asimétrica de hebras positivas y negativas durante la replicación, fenómeno asociado con la expresión de síntomas (Gowda *et al.*, 2000; López *et al.*, 2000; Satyanarayana *et al.*, 2002; Fagoaga *et al.*, 2005).

Como resultado de la replicación propensa a errores producto de la RdRp, los eventos de recombinación y la transmisión reiterada del virus mediada por el vector, los aislados naturales de CTV existen como poblaciones de variantes de secuencia estrechamente relacionadas que producen diversas características biológicas (Kong *et al.*, 2000, Rubio *et al.*, 2001). En este sentido, estudios de la diversidad poblacional de CTV son altamente relevantes para desarrollar estrategias de control, como la protección cruzada (PC), que es el método más utilizado actualmente. Folimonova *et al.* (2010) demostraron que la PC es genotipo específica, debido a la exclusión por súper infección. Por lo que los aislados pre-inmunizadores deben contener poblaciones homogéneas que provoquen síntomas suaves del genotipo que se desea controlar. Desde el punto de vista experimental, la transmisión por áfidos ha sido crucial para la separación de genotipos en las poblaciones de CTV (d'Urso *et al.*, 2000; Brlansky *et al.*, 2003; Sambade *et al.*, 2007; Roy & Brlansky, 2009).

En Uruguay, se ha establecido la presencia de aislados que provocan sintomatología severa y también la presencia del genotipo RB, único hasta el momento capaz de replicarse y moverse en *Poncirus trifoliata* (Benítez-Galeano *et al.*, 2015, 2018, 2021; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019; Rubio *et al.*, 2019). Es así, que, en el presente trabajo, se intentó aislar poblaciones homogéneas del genotipo RB y caracterizarlas desde el punto de vista biológico, molecular y evolutivo con el fin último de poder utilizarlas en un plan de PC.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Selección de subaislados mediante SSCP

Con el objetivo de trabajar con una población homogénea, la selección de subaislados se realizó a partir de aislados previamente separados por SAT y en base a los resultados de secuencia de los mismos para los genes p20, p23 y p25 (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019). Se analizó un total de 9 sub-aislados mediante

la técnica de polimorfismo de conformación de cadena simple (*Single-strand Conformation Polymorphism*, SSCP). El análisis se realizó sobre los productos de PCR del gen p25 en un gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata.

## 2.2. Caracterización biológica de subaislados

Las muestras seleccionadas son subaislados de la planta madre DSST, colectada en Salto, Uruguay en 2014 de un naranjo dulce (SwO) (*Citrus sinensis*) de campo, variedad 'Navelina', asintomático y mayor de 15 años (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019). Brevemente, luego de la colecta, el aislado fue inoculado en plantines de Lima Mexicana (ML) (*C. aurantifolia*) y mantenido en invernáculo a prueba de insectos y bajo condiciones de temperatura controlada hasta la segregación de poblaciones mediante SAT. Se realizó la caracterización biológica del aislado madre y los subaislados en cuatro especies indicadoras por un período de un año según Garnsey *et al.* (1987). Luego de 12 meses post-inoculación (MPI), se colectó tejido foliar de ML de los subaislados seleccionados para la presente tesis para la obtención del genoma viral.

En paralelo, se realizó la inoculación por injerto de los tres subaislados (DSST-13, DSST-17 y DSST-25) para la caracterización biológica. Se inocularon por triplicado en las cuatro especies indicadoras tradicionales, a saber: ML, SwO, Pomelo Duncan (PD) (*C. maxima*) y Naranjo Amargo (SO) (*C. aurantium*). El ensayo se realizó en invernáculo a prueba de insectos con temperatura controlada (18-27°C), y la infección por CTV se confirmó mediante RT-PCR en tiempo real según Bertolini *et al.* (2008). La evaluación de síntomas se realizó a los 2, 4, 6, 10 y 12 MPI, y la intensidad de cada síntoma fue clasificada como: 0 = asintomático, 1 = suave, 2 = moderado, y 3 = severo, de acuerdo a Garnsey *et al.* (1987). Los síntomas a evaluar en cada indicadora se muestran en la tabla 1. El promedio de intensidad (R) para cada indicadora se calculó como el promedio de intensidad de síntomas observados en las tres réplicas. Un índice total por hospedero (TIH) se calculó multiplicando R por un factor de ponderación establecido por la significancia económica relativa de cada hospedero: 1 para ML, 2 para SO, 3 para PD y 4 para SwO. Finalmente, un valor acumulado (C. score) para cada subaislado se obtuvo a partir de la suma de los cuatro TIHs.

Tabla 1. Síntomas evaluados en las distintas plantas indicadoras para la caracterización biológica.

Síntoma	Planta indicadora			
	ML	SO	PD	SwO
Aclaramiento de nervaduras	X			
Hoja en copa	X			
Acorchamiento de nervaduras	X			
Retraso en el crecimiento	X		X	X
Acanaladuras en la madera	X	X	X	X
Amarillamiento de plantas		X	X	
Clorosis				X

### 2.3. Extracción de RNA y secuenciación con Illumina

La extracción de RNA para la secuenciación de los genomas completos se realizó de la siguiente manera. Brevemente, cada muestra se procesó de manera individual, macerando 0,1 g de tejido en nitrógeno líquido y continuando la extracción de RNA total con el RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN<sup>®</sup>; Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se prepararon tres librerías de RNA *single-end* (150 pb) con el NEBNext Ultra II RNA Library Prep kit (Illumina, San Diego, CA, USA) en el laboratorio de Poblaciones Virales y Patogénesis del Institut Pasteur de París de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La secuenciación se realizó en la plataforma NextSeq 500 (Illumina) en el mismo laboratorio.

### 2.4. Análisis de datos

A continuación se muestra un flujograma de trabajo y en el anexo 1 se detallan los parámetros utilizados en cada etapa del análisis.



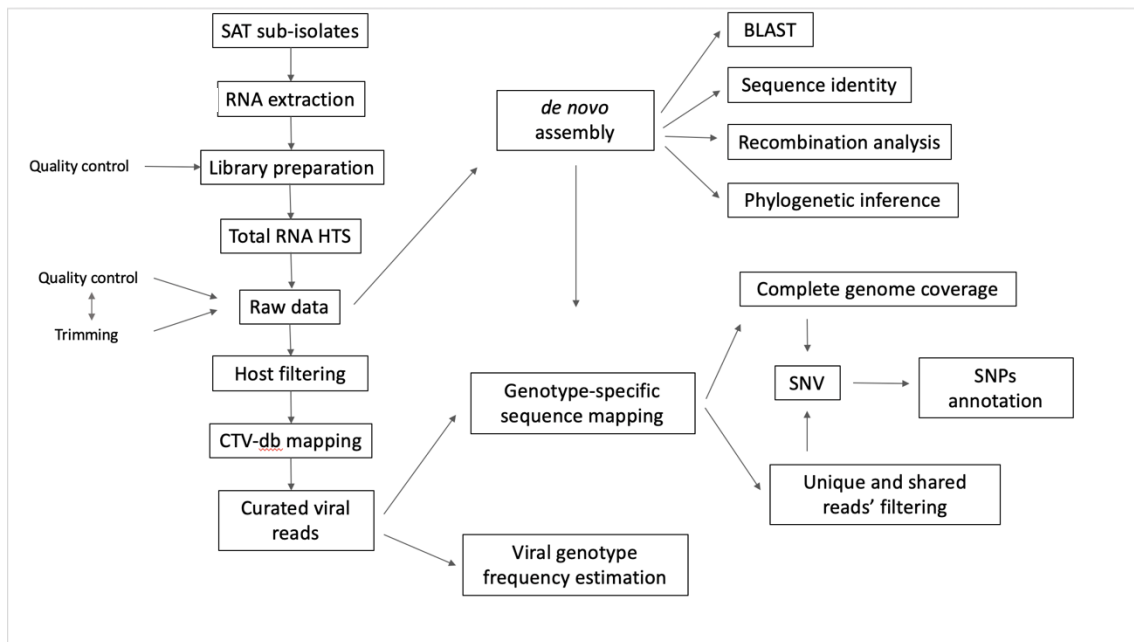


Figura 1. Esquema del flujo de trabajo aplicado a las muestras.

#### 2.4.1. Control de calidad, trimming de datos crudos y filtrado del hospedero

Los datos crudos de secuencia (archivos .bcl) fueron demultiplexados y convertidos a archivos fastq con el programa bsl2fastq v2.17 (illumina). El control de calidad de los reads, (antes y después del *trimming*), se realizó con FastQC vo.11.8 (Andrews, 2010). El *trimming* de los reads se realizó con el programa Trimmomatic vo.36 (Bolger *et al.*, 2014) de acuerdo al valor de calidad promedio de cada read, al valor de calidad de los extremos 5' y 3' y a un mínimo de longitud.

A continuación se realizó un paso de filtrado para remover reads del hospedero. Se mapearon los reads limpios al genoma de referencia de *C. sinensis* (NC\_023046 a NC\_023054) y el genoma cloroplástico (NC\_008334) utilizando el programa bowtie2 v2.2.6 (Langmead & Salzberg, 2012) utilizando parámetros predeterminados.

#### 2.4.2. Ensamblado *de novo* y análisis genético

Los reads limpios y filtrados no mapeados al genoma del hospedero, con una longitud promedio de 150 nt, fueron ensamblados *de novo* con el programa CLC Genomics Workbench v. 11 (QIAGEN). Los contigs mayores a 19.000 nt fueron

confirmados como genomas de CTV mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y fueron utilizados como genomas de referencia en los subsiguientes mapeos.

Se realizó el alineamiento de los genomas ensamblados *de novo* con todos los genomas completos de CTV disponibles en GenBank usando MAFFT v7.271 (Tabla suplementaria S1), y se obtuvo un alineamiento final con 78 secuencias de 19364 nt de longitud. Se realizó la inferencia del modelo de sustitución nucleotídica que mejor se ajustó a los datos (TVM+F+I+G4), y un árbol filogenético de máxima verosimilitud con aLRT de apoyo a los nodos utilizando el ModelFinder implementado en IQ-TREE v1.6.12 (Anisimova & Gascuel, 2006; Nguyen *et al.*, 2015; Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). El árbol filogenético fue visualizado con FigTree v1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Se realizaron análisis de recombinación entre los genomas obtenidos de los subaislados y también comparándolos con una base de datos de genomas consenso de los distintos genotipos descritos al momento (ver más adelante) utilizando los programas SimPlot v3.5.1 y Recombination Detection Program v4 (RDP4), respectivamente (Lole *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 2015).

Por último, para estimar las identidades de secuencia nucleotídicas y aminoacídicas, se concatenaron las secuencias codificantes del genoma completo (ORF 1a al 11) así como también las mitades 5' y 3' del genoma (ORF1a-1b y ORF2 al 11), utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor v7.0 (Hall, 1999).

#### 2.4.3. Base de datos de CTV y estimación de frecuencia de genotipos

Para conocer si los subaislados presentaban distintos genotipos en su población, los reads no mapeados a *C. sinensis* fueron mapeados con bowtie2 a una base de datos de CTV (CTV-db) realizada con secuencias consenso de genomas completos, obtenidas de GenBank, de cada uno de los 8 genotipos descritos al momento (T3, T30, T36, T68, HA16-5, VT, RB, S1) (Tabla suplementaria S1). Los reads mapeados a CTV-db fueron utilizados en los análisis subsiguientes.

Para estimar la frecuencia de cada genotipo dentro de los subaislados, se utilizó la mitad 5' del genoma, ya que casi no presenta reads compartidos entre genotipos.

Para esto se mapearon los reads correspondientes a cada genotipo presente en la muestra (en caso de coinfección) menos los reads compartidos entre genotipos, con el genoma de referencia de cada genotipo involucrado (genomas ensamblados *de novo*).

#### 2.4.4. Análisis y anotación de variantes genéticas

Para identificar la presencia de polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) en las distintas poblaciones virales, se utilizó el programa LoFreq v2.1.2 (Wilm *et al.*, 2012) que genera como salida un archivo vcf a partir del archivo BAM ordenado. Se seleccionaron los SNPs con una frecuencia mayor a 1% como lo establece la definición de polimorfismo.

Una vez identificados los SNPs fueron anotados con el programa snpEff v5.0 (Cingolani *et al.*, 2012), que utiliza los genomas de referencia anotados en formato .gff3 y agrega una columna en el archivo .vcf con información sobre el tipo de sustitución (sinónima, no sinónima o no codificante) de cada SNP.

#### 2.4.5. Reconstrucción de haplotipos

Por último se realizó la reconstrucción de las cuasiespecies de los distintos subaislados mediante el programa CliqueSNV v1.4.1 (Knyazev *et al.*, 2021), que reconstruye variantes virales intra-hospedero, altamente relacionadas y de baja frecuencia. Para la visualización de los haplotipos se realizaron redes de haplotipos con el método Network Net del programa SplitsTree4 v4.18.1 (Huson & Bryant, 2006).

### 3. Resultados

#### 3.1. Selección de subaislados y caracterización biológica

En la figura 2 se observan los resultados del SSCP para los 9 subaislados analizados, seleccionados a partir de Hernández-Rodríguez *et al.* (2019). Se observan solamente dos bandas para los subaislados DSST-13, DSST-17 y DSST-25, correspondientes a ambas hebras de DNA del amplicón, indicando la presencia de un único genotipo en la muestra. Por el contrario, subaislados como SNH-18, SNH-

25 o I58-9 muestran más de dos bandas, evidenciando la composición heterogénea de la muestra.

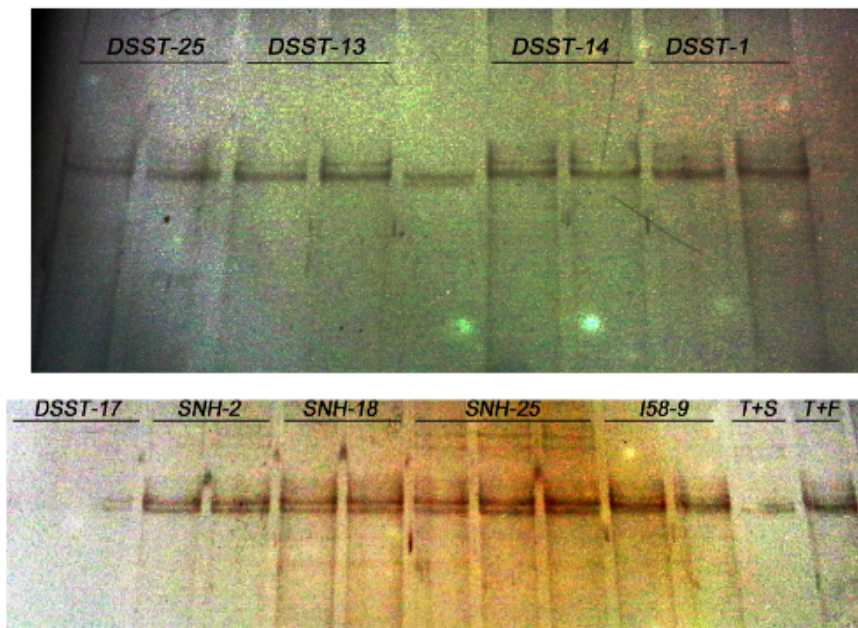


Figura 2. Gel de poliacrilamida al 8% teñido con nitrato de plata donde se observan los amplicones del gen p25 de los 9 subaislados. Se detallan los nombres de los sub-aislados sobre cada carril. T+S: testigo positivo suave; T+F: testigo positivo fuerte.

En cuanto a la caracterización biológica, se calculó el valor acumulado (C. score) de los síntomas para cada subaislado (Tabla 2). La intensidad de síntomas en el subaislado DSST-13 fue significativamente mayor que para los subaislados DSST-17 y DSST-25, con un valor de 23,3 contra 8,7 y 9,3, respectivamente. A su vez, DSST-13 fue el único subaislado que mostró síntomas de acanaladuras en la madera (SP) en pomelo.

Tabla 2. Resultados de la caracterización biológica. Se detalla el índice Total por Hospedero (TIH) y la presencia o ausencia de acanaladuras en la madera (SP) en cada una de las plantas indicadoras. También se detalla el valor acumulado (C. Score) de intensidad por hospedero. Neg: negativo; Pos: positivo.

	ML		SO		DG		SwO		C. Score
	TIH	SP	TIH	SP	TIH	SP	TIH	SP	
DSST-13	7,0	Neg	5,3	Neg	11	Pos	0	Neg	23,3
DSST-17	4,3	Neg	3,3	Neg	1	Neg	0	Neg	8,7
DSST-25	4,7	Neg	2,7	Neg	2	Neg	0	Neg	9,3

### 3.2. Estadísticas de los datos y frecuencia de genotipos

La cantidad de reads crudos obtenidos para cada librería se resume en la tabla 3. Luego de los filtros de calidad, trimming y extracción de reads del hospedero se realizó el mapeo de los reads contra la base de datos del virus (CTV-db) y se obtuvieron 3512, 15320 y 2334 reads virales para los datasets DSST-13, DSST-17 y DSST-25, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Estadísticas de los datasets.

Sample ID	Total reads	Total viral reads	Total mapped reads	Reference size (bp)	Mean coverage across genome (SD)	Insert size	Mean mapping quality
DSST-13-RB			2358	19269	18 (12)		37,8
	5508777	3512					
DSST-13-VT			2228	19115	17 (11)	151	36,5
DSST-17	9384563	15320	15320	19269	120 (49)		41,9
DSST-25	4316539	2334	2334	19269	18 (9)		41,7

En el resultado del mapeo de DSST-13 se puede observar reads que mapean a lo largo de todo el genoma con el genotipo VT, y también reads que mapean en distintas partes del genoma con los genotipos T36, RB y HA16-5 (Figura 3a). Este mismo patrón de mapeo con tres genotipos diferentes se observa para los subaislados DSST-17 y DSST-25 (Figura 3 b y c), sugiriendo la presencia de un genoma recombinante.

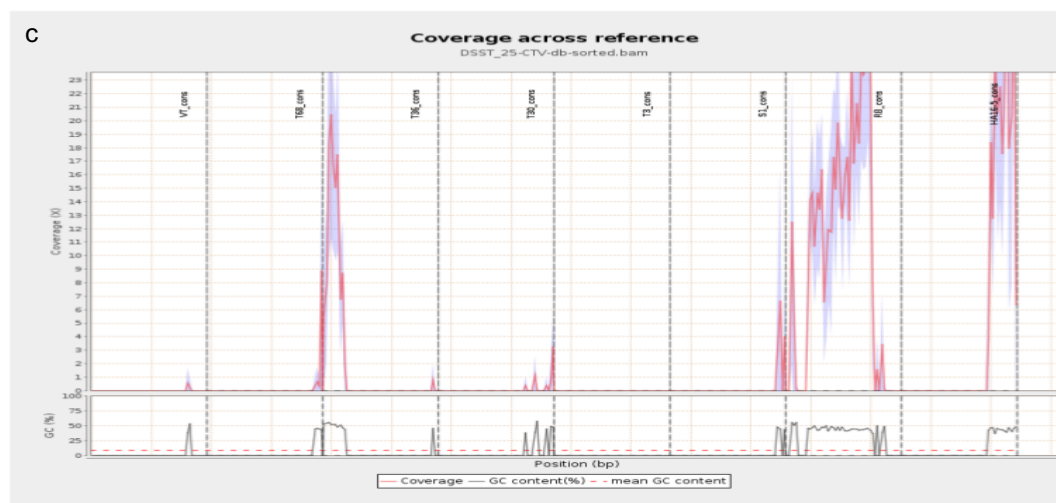
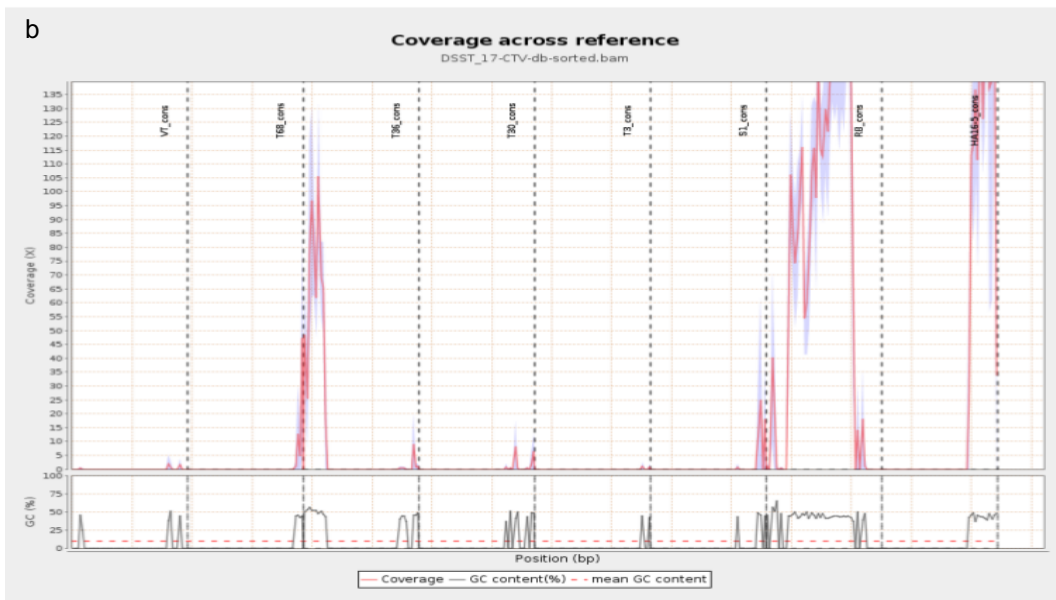
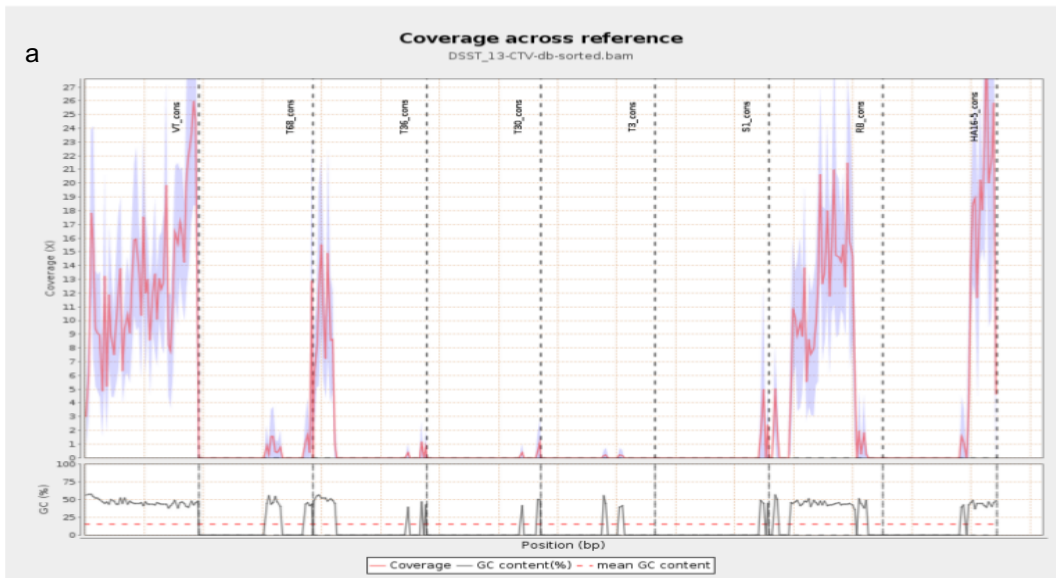


Figura 3. Cobertura de mapeo a lo largo del genoma con cada genotipo de la base de datos. a. DSST-13; b. DSST-17; c. DSST-25.

Los genomas ensamblados *de novo*, cuya longitud se detalla en la tabla 3, coinciden con los resultados obtenidos en el mapeo a la CTV-db. Todos los reads de las muestras DSST-17 y DSST-25 mapearon con su respectivo genoma de referencia (MH186146; Benítez-Galeano *et al.*, 2018), mientras que los reads virales correspondientes a DSST-13 mapearon con el genoma de referencia del genotipo RB (MH186146) y el del genotipo VT (DSST-13-VT), pudiéndose confirmar una co-infección de estos genotipos.

Cabe destacar que el genoma de referencia MH186146 corresponde al obtenido del subaislado DSST-17, y debido a la elevada similitud nucleotídica (ver más adelante) que presenta con los genomas ensamblados *de novo* del genotipo RB de los subaislados DSST-13 y DSST-25, fue el genoma de referencia utilizado para el genotipo RB en los subsiguientes análisis. Para el genotipo VT se utilizó el genoma ensamblado *de novo* del subaislado DSST-13.

A pesar de que la profundidad obtenida para las muestras, principalmente DSST-13 y DSST-25, no fue la esperada, se logró una cobertura total del genoma en todos los casos y con buena calidad de mapeo (Tabla 3, Figura 4).

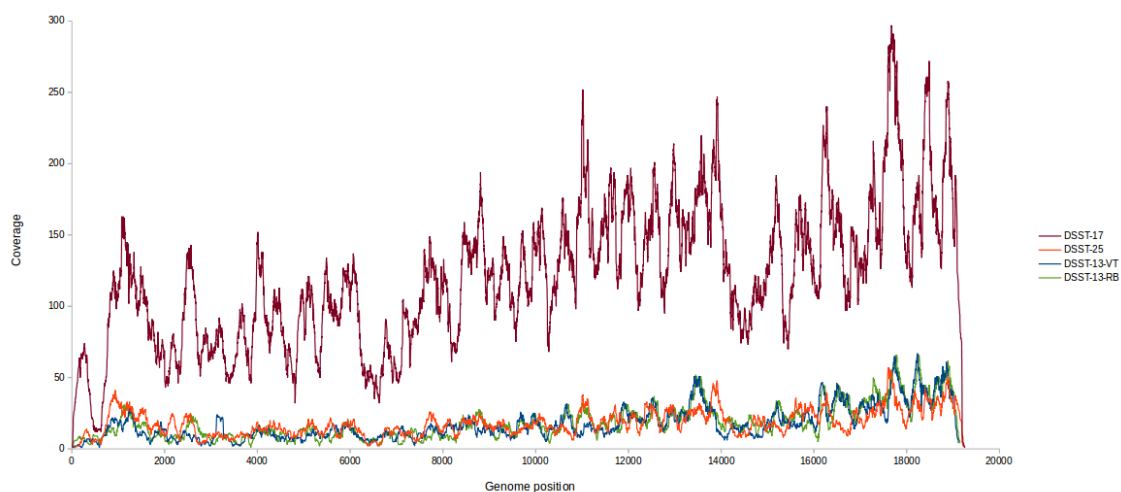


Figura 4. Cobertura de mapeo a lo largo del genoma de las muestras secuenciadas. Se graficó la distribución de cobertura con los reads filtrados mapeados a los respectivos genomas de referencia. Para el caso del subaislado co-infectado DSST-13 se mapearon los reads con ambas referencias (MH186146 y DSST-13-VT). Cada muestra se indica con un color diferente.

Dada la presencia de reads compartidos por la mitad 3' del genoma en el caso de la muestra co-infectada, se utilizó la mitad 5' del genoma (posición 1 a 10882 de MH186146) para el cálculo de frecuencia de los genotipos. Para esto se volvió a realizar el mapeo de los reads limpios a la mitad 5' de la CTV-db y con esos *datasets* se mapeó a la mitad 5' de los genomas de referencia. Con esto se obtuvo la diferencia entre reads mapeados a cada genotipo de referencia menos los reads compartidos entre ambos (Tabla 4).

Tabla 4. Cálculo de frecuencia de genotipos para cada subaislado.

	Total	Mapeados	Compartidos	Diferencia	Frecuencia
DSST-13-RB	1574	817	52	765	48,60
DSST-13-VT	1574	808	52	756	48,03
DSST-17-RB	6712	6703	222	6481	96,56
DSST-17-VT	6712	222	222	0	0,00
DSST-25-RB	1011	1010	32	978	96,74
DSST-25-VT	1011	32	32	0	0,00

Para el subaislado co-infectado se obtuvo una frecuencia de casi la mitad para los genotipos RB y VT, mientras que para los subaislados DSST-17 y DSST-25 se encontró solamente la presencia del genotipo RB (Figura 5).

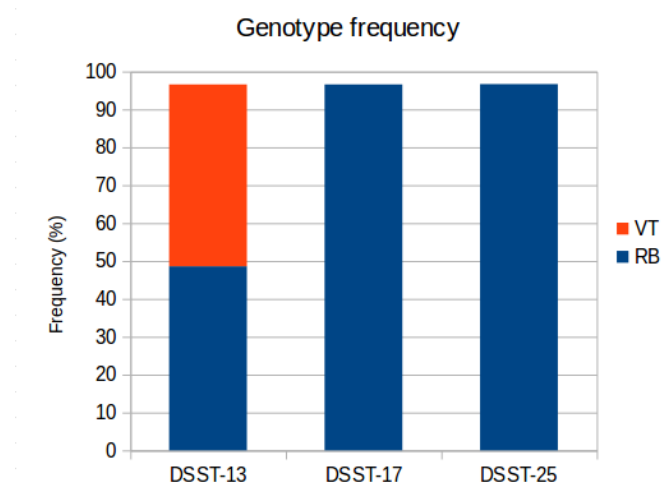


Figura 5. Frecuencia de genotipos para los subaislados DSST-13, DSST-17 y DSST-25.



### 3.3. Análisis de los genomas completos

Mediante análisis filogenético logramos confirmar que los genomas ensamblados *de novo* corresponden a los genotipos RB y VT (Figura 6). Podemos observar la agrupación de tres de los genomas en el cluster del genotipo RB (señalado en azul) y la cuarta secuencia dentro del genotipo VT (señalado en rojo). El apoyo de los nodos para todos los clados fue de aLRT 1.

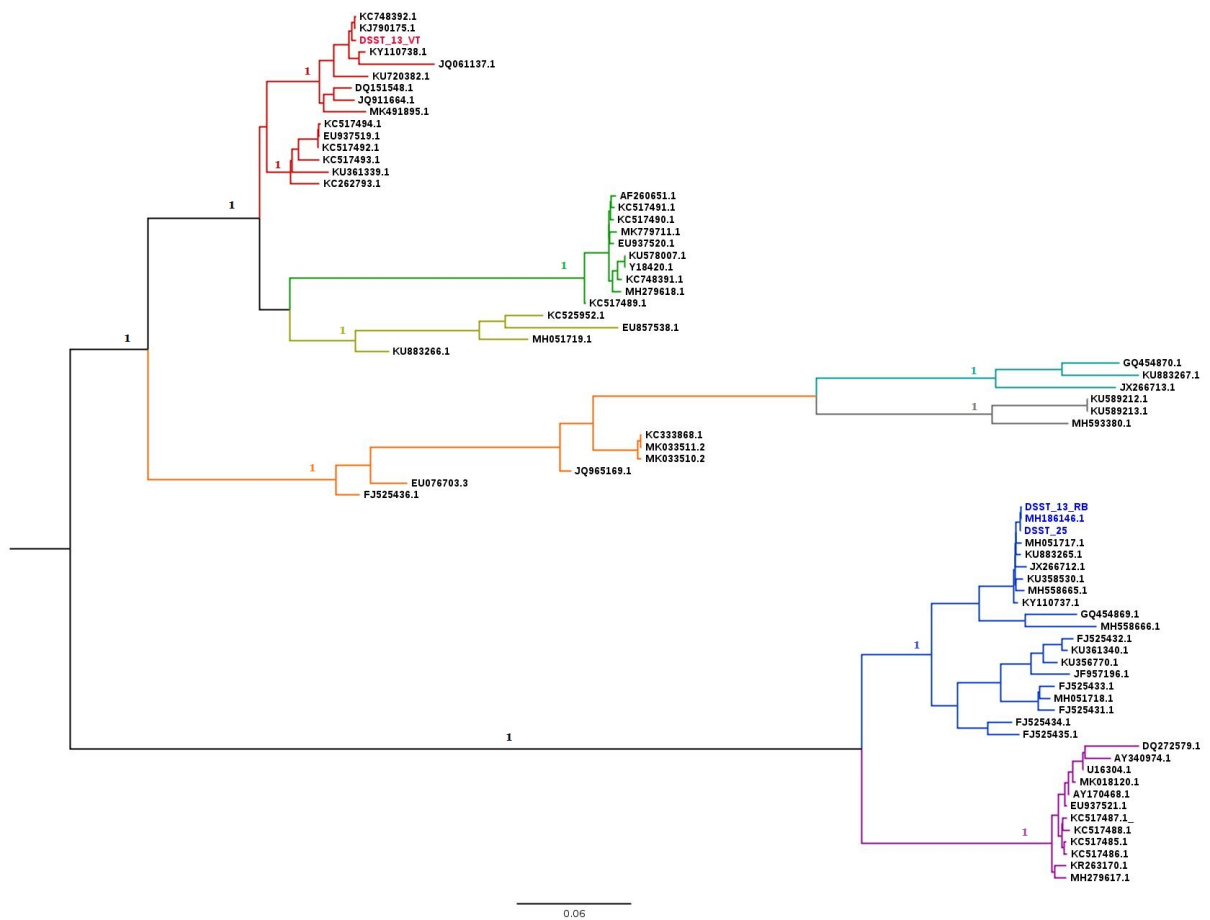


Figura 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud realizado con genomas completos de CTV. Los distintos genotipos descritos al momento están resaltados con color: VT (rojo), T30 (verde), T3 (amarillo); HA16-5 (turquesa); S1 (gris); T68 (anaranjado), RB (azul) y T36 (violeta). Los subaislados de la presente tesis se destacan en color.

Al realizar un análisis comparativo entre los genomas, con todas las regiones codificantes concatenadas, observamos que los genomas del genotipo RB de los subaislados DSST-13, DSST-17 y DSST-25 presentan una similitud de 99.9% tanto a

nivel nucleotídico como aminoacídico. Sin embargo, la similitud de estos genomas con el obtenido del genotipo VT (subaislado DSST-13) fue tan solo del 68.1% a nivel nucleotídico y 80.8% a nivel aminoacídico (Tabla 5).

Tabla 5. Similitud genética nucleotídica y aminoacídica entre las regiones codificantes del genoma completo de los subaislados. La similitud aminoacídica se resalta en negrita.

	Complete genome			
	DSST-13-VT	DSST-13-RB	DSST-17	DSST-25
DSST-13-VT		68,1	68,1	68,1
DSST-13-RB	<b>80,8</b>		99,9	99,9
DSST-17	<b>80,8</b>	<b>99,9</b>		99,9
DSST-25	<b>80,8</b>	<b>99,9</b>	<b>99,9</b>	

Sin embargo, cuando comparamos la región codificante de la mitad 5' (ORF1a-1b) y 3' (ORF2-11) de los genomas, observamos que los porcentajes de similitud, tanto nucleotídica como aminoacídica, aumentan hacia la mitad 3' del genoma (Tabla 6).

Tabla 6. Similitud genética nucleotídica y aminoacídica entre las regiones codificantes de la mitad 5' (ORF1a-1b) y 3' (ORF2-11) del genoma de los subaislados. La similitud aminoacídica se resalta en negrita.

	ORF1a-1b				ORF2-11			
	DSST-13-VT	DSST-13-RB	DSST-17	DSST-25	DSST-13-VT	DSST-13-RB	DSST-17	DSST-25
DSST-13-VT		77,1	77,1	77,1		92,9	93	93
DSST-13-RB	<b>74,1</b>		99,9	100	<b>89,9</b>		99,9	99,9
DSST-17	<b>74,1</b>	<b>99,9</b>		99,9	<b>89,9</b>	<b>99,9</b>		100
DSST-25	<b>74,1</b>	<b>100</b>	<b>99,9</b>		<b>89,9</b>	<b>99,9</b>	<b>99,9</b>	

Este aumento en la similitud hacia la mitad 3' del genoma también se observa en el análisis de SimPlot realizado entre los genomas obtenidos de los subaislados (Figura 7). En este caso la secuencia *query* es la MH186146 y podemos ver como casi no se observan los genomas DSST-13-RB y DSST-25 (líneas roja y amarilla, respectivamente), debido a la altísima similitud nucleotídica presentada, mientras que la línea verde representa la divergencia del genoma DSST-13-VT que va disminuyendo hacia el extremo 3' del genoma de CTV (Figura 7).

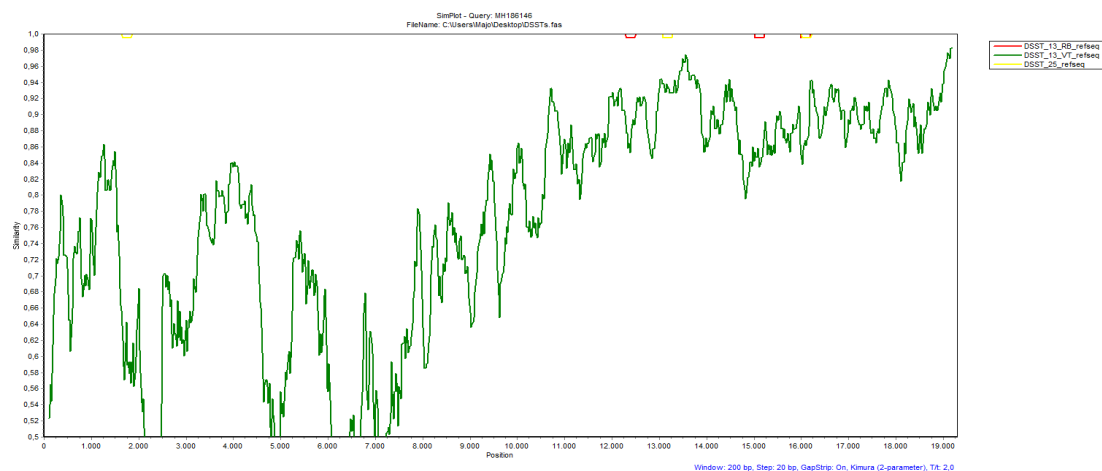


Figura 7. Análisis de similitud nucleotídica de los genomas completos de los subislados realizado con el programa SimPlot. La secuencia query es la MH186146. Los genomas DSST-13-VT, DSST-13-RB y DSST-25 se representan en verde rojo y amarillo, respectivamente.

Por último, en la comparación de los genomas con la base de datos CTV-db, podemos ver mediante el análisis de Bootscan la naturaleza recombinante de los genomas del genotipo RB, previamente descrita en Benítez-Galeano *et al.*, 2018. Como se puede observar en la parte superior de la figura 8, el patrón de recombinación coincide con el observado inicialmente durante el mapeo de los reads virales a CTV-db (Figura 3), donde observamos una primera región del genotipo T36, luego otra del genotipo RB y por último un fragmento del genotipo HA16-5 (Benítez-Galeano *et al.*, 2018).

En cuanto al genoma DSST-13-VT (Figura 8 parte inferior), podemos observar en el análisis de Bootscan que se corresponde con el genoma consenso del genotipo VT en toda su longitud.

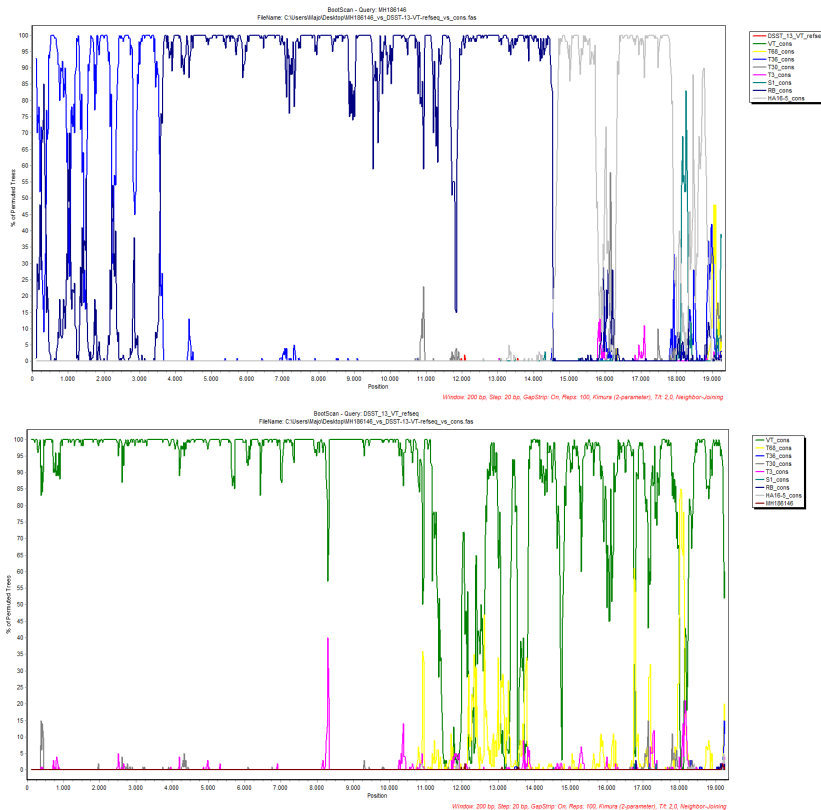


Figura 8. Análisis de Bootscan de los genomas completos de los subaislados con la base de datos de CTV, realizado con el programa SimPlot. En la parte superior, la secuencia query MH186146 y en la inferior es el genoma DSST-13-VT.

### 3.4. Análisis de variantes genéticas

Con el fin de poder identificar las variantes nucleotídicas únicas (SNV) de cada genotipo, se trabajó con los datasets de reads únicos de cada genotipo y por otro lado con los reads compartidos entre VT y RB del subaislado DSST-13.

Cuando se analizaron los sets de datos con reads únicos para cada genotipo, se detectó un total de 14 variantes con una frecuencia mayor al 1% entre los 4 subaislados. En la tabla 7 se detallan los polimorfismos encontrados y en la figura 9 se puede observar su distribución a lo largo de cada genoma.

Para el aislado DSST-13 se encontraron 5 polimorfismos producidos por el genotipo RB. Uno de ellos fue una variante sinónima, donde se mantuvo el aminoácido Asp, pero la variante alternativa se encontró en una frecuencia de 1. Otros dos cambios fueron no sinónimos, donde cambió el aminoácido (aa) Arg por His (ambos polares con carga positiva) en la posición 856 de la poliproteína con una frecuencia de 0,16,

y el otro fue un cambio de Tyr por Phe (ambos aa aromáticos) en la posición 452 de la proteína P61 con una frecuencia de 0,91. Por último, los dos cambios no codificantes ocurrieron en la región 3'UTR (Tabla 7, Figura 9).

En el caso de las variantes aportadas por los reads únicos del genotipo VT dentro del subaislado DSST-13 fueron 3 cambios sinónimos ocurridos en la proteína P65 con una frecuencia alélica alternativa de alrededor de 0,4 (Tabla 7, Figura 9).

El subaislado DSST-17 presentó dos SNPs no sinónimos, ambos en baja frecuencia. El primero fue un cambio en la posición 1749 de la poliproteína correspondiente al aa 548, que cambió de una Gly a una Ser (ambos aa polares sin carga) en el 27% de los reads que cubren esa posición. El otro cambio fue de una Met a una Val, otro aa no polar, en el aa 502 de la proteína P65.

Por último, el subaislado DSST-25 presentó 4 SNPs, dos de ellos en la región de la poliproteína. El primero fue un cambio en la posición 545 de un aa polar sin carga, Ser, por una Pro que es un aa no polar. El segundo, ubicado 3 aa hacia abajo, fue el cambio de Gly por Ser en la posición 548 de la proteína. En la proteína P65 ocurrió un cambio sinónimo donde se mantuvo una Ala, y en la posición 16079 del genoma, región de control del gen p25, ocurrió un cambio no codificante con una frecuencia de 1.

Cabe resaltar que el cambio Gly<sub>548</sub>Ser en la poliproteína fue compartido entre los subaislados DSST-17 y DSST-25, con frecuencias del alelo alternativo de 0,27 y 1, respectivamente.

Tabla 7. Cambios aminoacídicos generados por los reads únicos de cada genotipo. Se detalla la posición en el genoma (respecto a MH186146), la frecuencia del alelo alternativo, el aminoácido generado y el ORF afectado.

Genome position	Alternative allele frequency	Sample	Type	ORF
2674	0,16		Arg 856 His	polyprotein
12365	1,00		114 Asp	p65
15086	0,91	DSST-13-RB	Tyr 452 Phe	p61
19066	0,52			3'UTR
19127	0,56			3'UTR
13331	0,43		436 Lys	p65
13343	0,43	DSST-13-VT	440 Asn	p65
13367	0,46		448 Val	p65
1749	0,27	DSST-17	Gly 548 Ser	polyprotein
13527	0,10		Met 502 Val	p65
1740	0,29		Ser 545 Pro	polyprotein
1749	1	DSST-25	Gly 548 Ser	polyprotein
13154	1		377 Ala	p65
16079	1			upstream p25

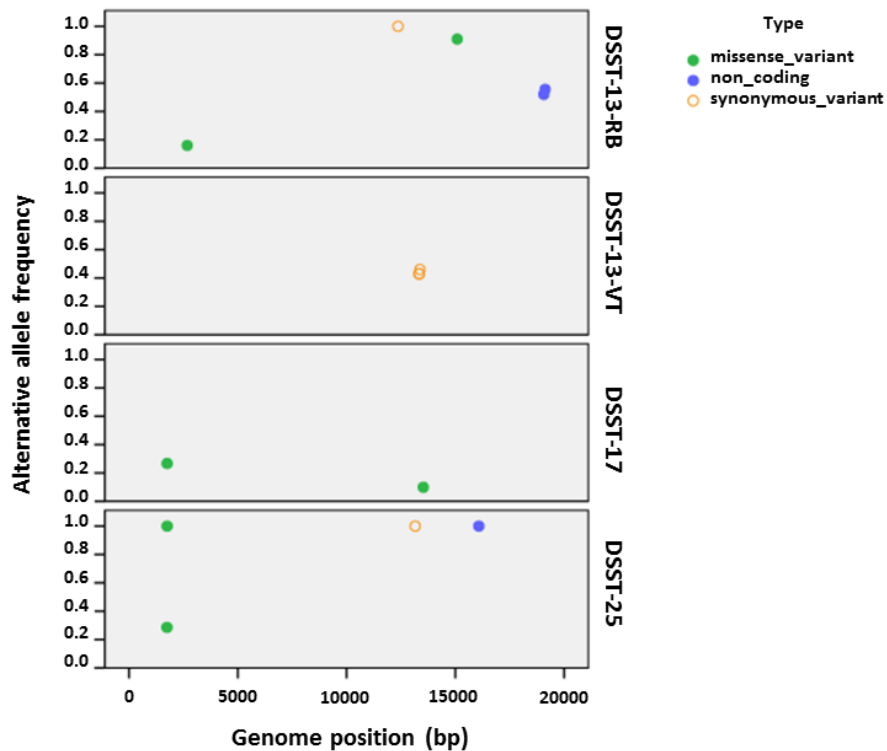


Figura 9. Distribución de los SNPs únicos de cada genotipo a lo largo del genoma para cada subaislado. En el eje x se detalla la posición del genoma de CTV y en el eje y la frecuencia de cada SNP. Los distintos colores indican el tipo de cambio producido por el SNP.

En cuanto a los cambios proporcionados por los reads compartidos, presentes únicamente en el subaislado coinfectado DSST-13, se encontraron un total de 129 SNPs distribuidos de la posición 10680 del genoma hacia el extremo 3' (Figura 10). De estos 129 SNPs, 97 fueron cambios sinónimos, 21 fueron cambios no sinónimos y 11 fueron cambios no codificantes que cayeron en regiones reguladoras intergénicas o en la región 3'UTR (Tabla 8). Los únicos ORFs que no presentaron cambios fueron el 2 y el 6, codificantes de las proteínas P33 y P27, respectivamente.

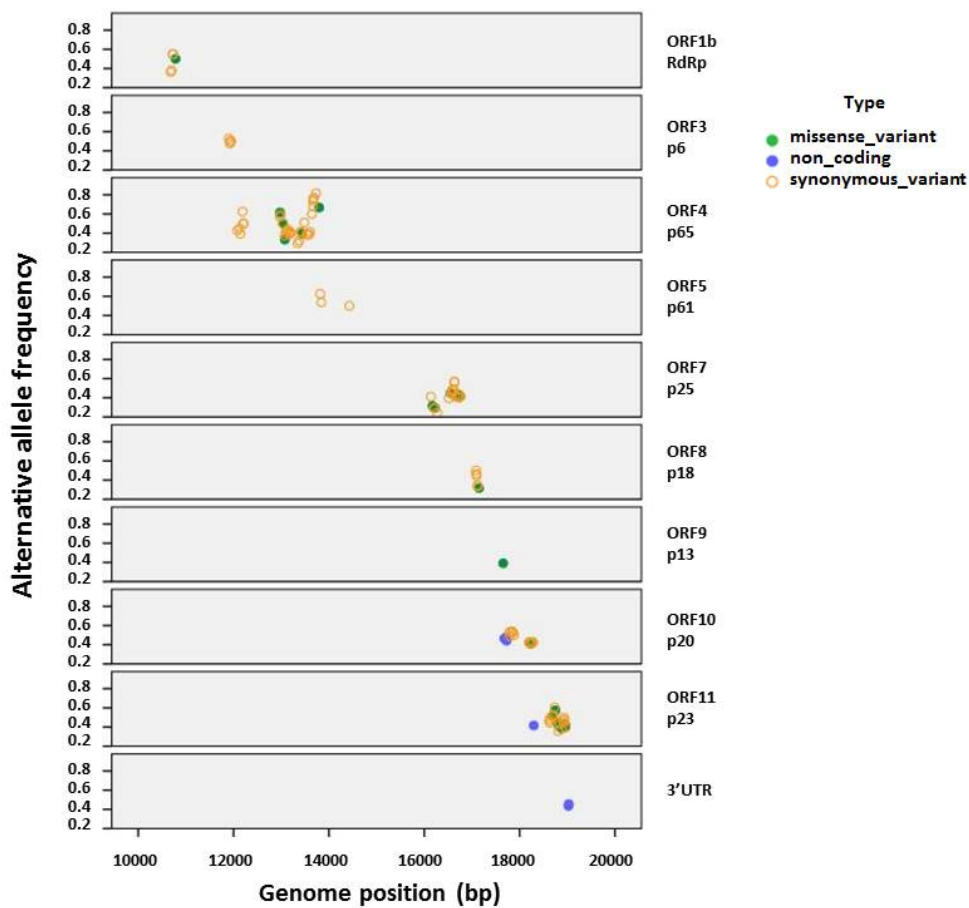


Figura 10. Distribución de los SNPs a lo largo del genoma generados por los reads compartidos en el subaislado DSST-13. En el eje x se detalla la posición del genoma de CTV y en el eje y la frecuencia de cada SNP. Los distintos colores indican el tipo de cambio producido por el SNP y cada recuadro corresponde a un ORF diferente.

Tabla 8. Cambios aminoacídicos generados por los reads compartidos del subaislado DSST-13. Se detalla la posición en el genoma (respecto a MH186146), la frecuencia del alelo alternativo, el aminoácido generado y el ORF afectado. En rojo se resaltan cambios no sinónimos y, si no se especifica, el cambio fue en una región no codificante.

Genome position	Alternative allele frequency	Type of change	Affected Protein
10680	0,36	Asp427Asp	RdRp
10701	0,38	Leu434Leu	RdRp
10719	0,55	Leu440Leu	RdRp
10731	0,55	Arg444Arg	RdRp
10783	0,50	<b>Ala462Thr</b>	RdRp
11898	0,53	Leu12Leu	p6
11922	0,48	Ala20Ala	p6
11934	0,50	Leu24Leu	p6
11937	0,50	Ile25Ile	p6
11946	0,50	Val28Val	p6
12080	0,43	Thr29Thr	p65
12128	0,45	Pro35Pro	p65
12143	0,39	Leu40Leu	p65
12188	0,63	Tyr55Tyr	p65
12200	0,50	Ser59Ser	p65
12212	0,50	Gly63Gly	p65
12971	0,57	Ser316Ser	p65
12975	0,62	<b>Ser318Pro</b>	p65
12989	0,59	Ser322Ser	p65
13035	0,50	Leu338Leu	p65
13041	0,50	<b>Ala340Thr</b>	p65
13070	0,38	Gly349Gly	p65
13074	0,33	<b>Val351Ile</b>	p65
13094	0,40	Arg357Arg	p65
13109	0,43	Arg362Arg	p65
13133	0,44	Cys370Cys	p65
13169	0,39	Cys382Cys	p65
13172	0,39	Ile383Ile	p65
13184	0,42	Leu387Leu	p65
13190	0,40	Val389Val	p65
13196	0,40	Thr391Thr	p65
13346	0,29	Glu441Glu	p65
13379	0,32	Thr452Thr	p65



13403	0,41	Pro460Pro	p65
13430	0,41	Thr469Thr	p65
13432	0,39	Lys470Arg	p65
13484	0,51	Glu487Glu	p65
13538	0,39	Pro505Pro	p65
13544	0,40	Arg507Arg	p65
13583	0,38	Ala520Ala	p65
13604	0,41	Thr527Thr	p65
13643	0,60	Thr540Thr	p65
13664	0,68	Ala547Ala	p65
13668	0,73	Leu549Leu	p65
13670	0,76	Leu549Leu	p65
13685	0,77	Ser554Ser	p65
13730	0,81	Ile569Ile	p65
13797	0,67	Val592Ile	p65
<hr/>			
13818	0,63	Glu25Lys	p61
13839	0,54	Ile32Val	p61
14430	0,50	Tyr229His	p61
<hr/>			
16140	0,41	Glu4Glu	p25
16171	0,31	Ala15Thr	p25
16200	0,29	Ala24Ala	p25
16218	0,29	Ser30Ser	p25
16227	0,29	Phe33Leu	p25
16272	0,24	Leu48Leu	p25
16515	0,39	Ile129Ile	p25
16553	0,45	Ser142Thr	p25
16572	0,44	Leu148Leu	p25
16575	0,46	Ala149Ala	p25
16590	0,48	Asn154Asn	p25
16596	0,48	Asn156Asn	p25
16608	0,48	Gly160Gly	p25
16618	0,48	Leu164Leu	p25
16629	0,57	Gly167Gly	p25
16635	0,57	Pro169Pro	p25
16647	0,42	His173His	p25
16701	0,41	Ala191Ala	p25
16708	0,43	Ile194Leu	p25
16722	0,40	Glu198Glu	p25
16731	0,43	Leu201Leu	p25

16752	0,41	Gluzo8Glu	p25
16753	0,41	Ile209Val	p25
17086	0,50	Thri07Thr	p18
17092	0,46	Lysi09Lys	p18
17095	0,44	Ser110Ser	p18
17116	0,35	Ala117Ala	p18
17119	0,33	Ile118Ile	p18
17147	0,32	Ile128Val	p18
17655	0,39	Asp118Gly	p13
17680	0,46		p20
17700	0,46		p20
17712	0,46		p20
17714	0,46		p20
17715	0,48		p20
17716	0,48		p20
17717	0,45		p20
17726	0,44		p20
17785	0,53	Lys16Lys	p20
17794	0,49	Ala19Ala	p20
17830	0,54	Leu31Leu	p20
17848	0,54	Glu37Glu	p20
17857	0,53	Asp40Asp	p20
17881	0,50	Val48Val	p20
18193	0,43	Ala152Ala	p20
18199	0,43	Ala154Ala	p20
18232	0,41	Val165Val	p20
18233	0,41	Ala166Ser	p20
18268	0,43	Val177Val	p20
18274	0,43	Pro179Pro	p20
18277	0,42	Ser180Ser	p20
18296	0,42		p23
18618	0,46	Lys84Lys	p23
18630	0,49	Asn88Asn	p23
18636	0,44	Thr90Thr	p23
18681	0,51	Val105Val	p23
18684	0,51	Lys106Lys	p23
18697	0,52	Arg111Gly	p23
18702	0,52	Lys112Lys	p23
18735	0,61	Ala123Ala	p23

18751	0,58	His129Tyr	p23
18778	0,45	Asp138Asn	p23
18808	0,36	Leu148Leu	p23
18843	0,44	Glu159Glu	p23
18853	0,39	His163Tyr	p23
18870	0,40	Met168Ile	p23
18879	0,38	Lys171Lys	p23
18883	0,40	Met173Val	p23
18892	0,43	Asp176Asn	p23
18906	0,47	Val180Val	p23
18924	0,44	Glu186Glu	p23
18930	0,50	Thr188Thr	p23
18948	0,48	Val194Val	p23
18963	0,39	Ser199Ser	p23
18965	0,41	Gly200Asp	p23
19021	0,44		3'UTR
19030	0,45		3'UTR

Por último, la reconstrucción de haplotipos se realizó con el programa Clique SNV que se basa en la construcción de un grafo de SNV, donde las SNVs son los nodos y los bordes conectan SNVs unidos. Luego, se unifican los cliques en el grafo y se identifican los haplotipos.

Para los subaislados DSST-17 y DSST-25 el programa reconstruyó un único haplotipo en cada caso, ambos del genotipo RB, que se observan en la figura 11. En el caso del subaislado co-infectado, se reconstruyeron 24 haplotipos para el genotipo RB y 28 para el genotipo VT utilizando todos los reads, tanto únicos como compartidos (Figuras 11 y 12). Sin embargo, al utilizar los reads únicos de cada genotipo, los haplotipos formados fueron 2 para RB y 1 para VT (Figuras 11 y 12).

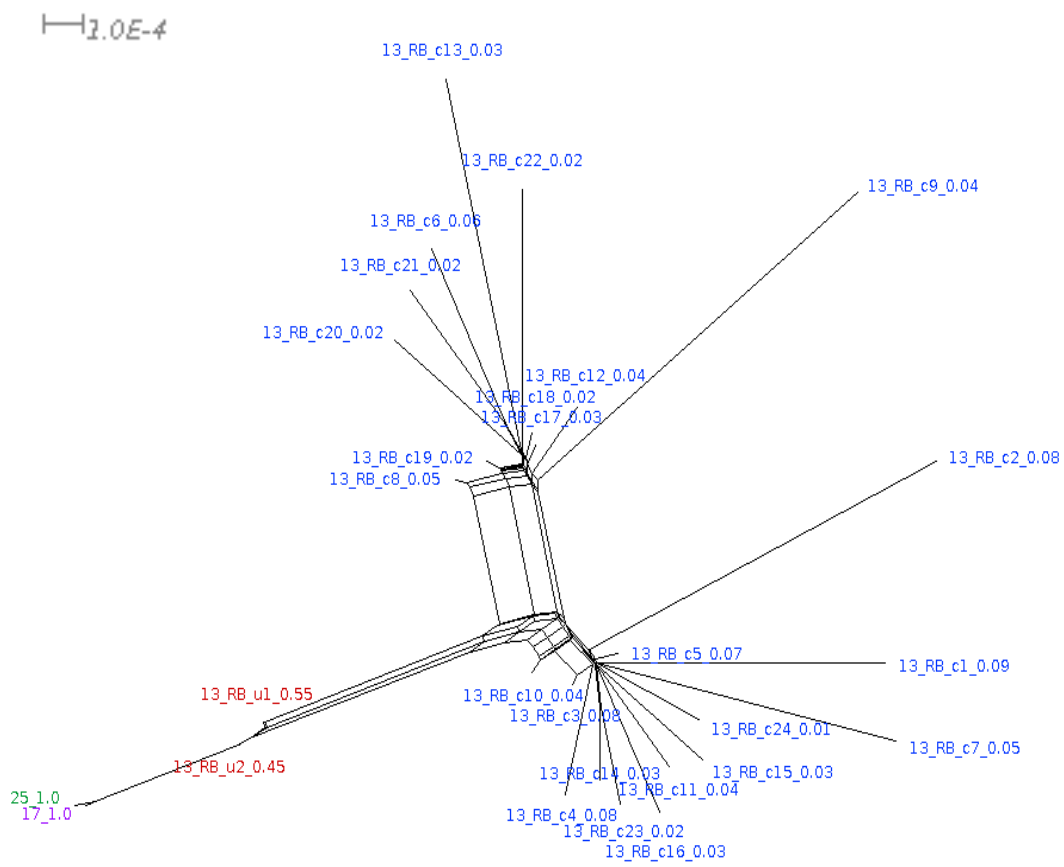


Figura 11. Red de haplotipos del genotipo RB de los subaislados DSST-13, DSST-17 y DSST-25. En violeta y verde se muestra el haplotipo único de los subaislados DSST-17 y DSST-25, respectivamente, ambos con una frecuencia de 1. En rojo se muestran los dos haplotipos del genotipo RB del subaislado DSST-13, y sus respectivas frecuencias, generados por los reads únicos del genotipo. En azul se observan los haplotipos formados por todos los reads del subaislado DSST-13 y sus frecuencias.

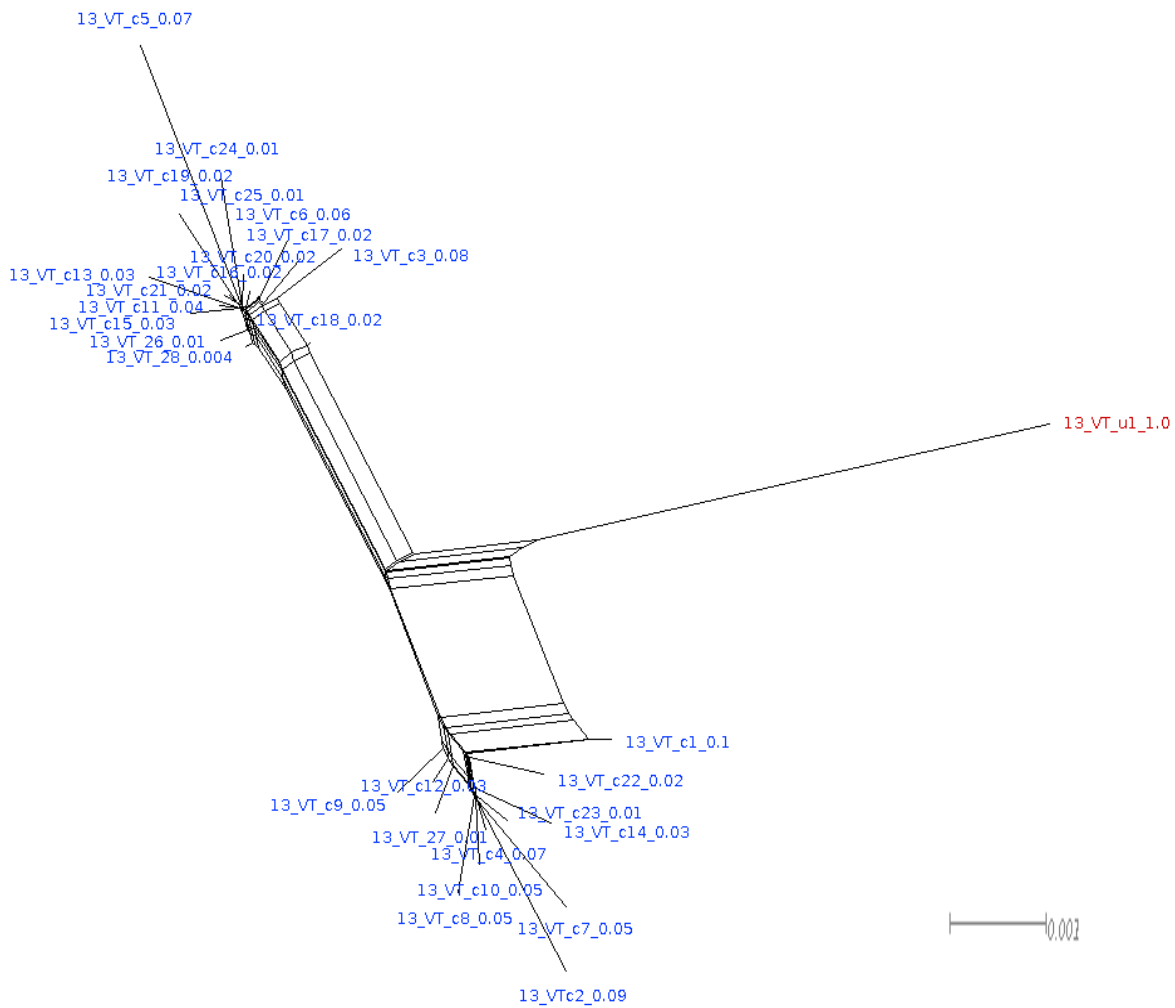


Figura 12. Red de haplotipos del genotipo VT del subaislado DSST-13. En rojo se destaca el haplotipo generado por los reads únicos del genotipo y en azul los haplotipos formados por todos los reads, tanto únicos como compartidos. Se destaca la frecuencia de cada haplotipo. h

#### 4. Discusión

Se ha descrito la protección cruzada como el mecanismo más eficiente de control de CTV (Roistacher *et al.*, 2010, Folimonova, 2013). Aunque no está claro su mecanismo de acción a nivel molecular (se cree que funciona por RNA interferencia), sabemos que funciona de manera genotipo específica y que el aislado protector debe ser homogéneo para que el efecto sea duradero (Folimonova, 2013; Scott *et al.*, 2013). Como otros virus RNA, CTV se organiza en poblaciones de variantes genéticas similares, producto de mutaciones causadas por

la elevada tasa de error de la RNA polimerasa (Domingo & Holland, 1997; Brlansky *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2013). A su vez, debido a la longevidad del hospedero y a la continua reinfección en el campo a causa del insecto vector del virus, estas poblaciones pueden estar compuestas por más de un genotipo.

Una de las maneras más utilizadas para disminuir la variabilidad genética de las poblaciones es la transmisión por un solo áfido (SAT), técnica que genera cuellos de botella transmitiendo una proporción de la variabilidad genética original (Broadbent *et al.*, 1996; Brlansky *et al.*, 2003; Nolasco *et al.*, 2008).

Con el objetivo de caracterizar aislados homogéneos del genotipo HA16-5 (o NC) altamente representado en el país, se seleccionaron 3 subaislados obtenidos por SAT y previamente caracterizados como HA16-5 mediante 3 regiones parciales del genoma (genes p25, p20 y p23) (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2019). Para confirmar la presencia de poblaciones homogéneas se realizó un análisis por SSCP y se seleccionaron los subaislados 13, 17 y 25 del aislado madre DSST como homogéneos y del genotipo HA16-5. Sin embargo, al reconstruir los genomas completos de los subaislados, con datos de secuenciación masiva, se observaron dos aspectos interesantes. Primero, los subaislados no pertenecían al genotipo HA16-5 sino al genotipo RB. Segundo, la técnica de SAT no logró separar genotipos en uno de los subaislados, que presentó una co infección entre los genotipos VT y RB.

En cuanto al primer punto, CTV es el virus de plantas más grande descrito hasta el momento, con un genoma de 19,3 kb. Previamente se ha mencionado que la asignación de genotipos mediante análisis de regiones parciales no siempre es certera, debido a la existencia de genomas recombinantes como se observa en este caso (Harper, 2013). El genoma del genotipo RB presente en los subaislados DSST-13, 17 y 25 es de origen recombinante entre los genotipos T36, RB y HA16-5 (Benítez-Galeano *et al.*, 2018), y los genes p25, p23 y p20 utilizados en la caracterización previa se encuentran en la porción final del genoma, hacia el extremo 3', explicando así la asignación al genotipo HA16-5.

Respecto a la separación de genotipos por SAT, podemos mencionar dos aspectos importantes. Si bien el áfido transmite sólo una proporción de los genomas presentes en la planta, dada la cantidad limitada de sitios de unión del virus a la probóscide del insecto, la distribución de la población viral no es homogénea en la

planta. Es decir, los áfidos se alimentan en distintos lugares de la planta antes de ser trasladados al nuevo plantín, pudiendo así transmitir distintos genomas presentes en la población madre. La transmisión por áfidos ha sido reportada como altamente variable, es decir, que distintos genotipos presentan distinta eficiencia de transmisión, existiendo una tendencia mayor de transmisión hacia los genotipos más severos (Calavan *et al.*, 1980; Roistacher *et al.*, 1980; Yokomi *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011). Entonces, el evento de separación o disminución de variabilidad genética mediante SAT es un evento que depende de factores tales como composición poblacional, distribución de genotipos en la planta y eficiencia de transmisión de los genotipos, así como también de la temperatura y variedad del cultivar (Bar-Joseph & Loebenstein, 1973; Yokomi *et al.*, 2010).

Los trabajos previos que utilizan SAT para separar poblaciones virales, no realizan análisis de genomas completos mediante secuenciación masiva, pudiendo haber pasado por alto variantes minoritarias que sí son observadas con esta técnica. A su vez, en nuestro caso, surge la interrogante de si con una profundidad mayor de secuenciación se hubiesen observado variantes minoritarias del genotipo VT en los subaislados 17 y 25, que claramente estaba presente en el aislado madre. Cabe destacar, que la profundidad de secuenciación no fue la deseada debido a que no se realizó un tratamiento previo de depleción de RNA ribosomal y la alta cantidad de estas moléculas compite con la secuenciación de los RNA virales. Sin embargo, se lograron obtener los genomas completos, con reads cubriendo toda la longitud del genoma y con profundidad suficiente para establecer variantes minoritarias.

La complejidad de las poblaciones virales está relacionada con la patogenicidad e intensidad de los síntomas que genera el virus en la planta. En el caso de los subaislados analizados en esta tesis, se observó que produjeron distinto grado de afectación en las plantas indicadoras correlacionada con la presencia o ausencia de más de un genotipo en la población. El subaislado DSST-13, conformado por una población mixta de los genotipos VT y RB, mostró síntomas más severos que los subaislados 17 y 25, siendo el único que generó SP en pomelo.

Al analizar en profundidad los subaislados, observamos que esta correlación entre sintomatología más severa y presencia de más de un genotipo, se vió reflejada también en la presencia de más cantidad de SNPs en el subaislado 13, que en los

subaislados 17 y 25. Es extremadamente interesante observar la presencia de reads compartidos entre ambos genotipos del subaislado 13, que justamente se ubican en la mitad 3' del genoma, región que se transcribe mediante RNAs subgenómicos, y que mayoritariamente produjeron cambios sinónimos. Este fenómeno se observa ampliamente en virus RNA, en los cuales se generan variantes minoritarias estrechamente relacionadas formando el “espacio de secuencia”, que funciona como un *backup* frente a cambios en el ambiente para preservar el *fitness* elevado de la población. Este “espacio de secuencia” puede observarse en la estrecha relación entre variantes minoritarias reconstruidas en las redes de haplotipos. Por último, sería interesante analizar la convergencia de la variante alternativa en la posición 1749 del genoma, que generó el cambio Gly548Ser en los subaislados 17 y 25, para ver si existe una mayor eficiencia de la misma en cuanto al uso de codones del virus y al efecto en el *fitness* dado el cambio aminoacídico.

## 5. Bibliografía

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

Andrews S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Anisimova M & Gascuel O. 2006. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst. Biol.* 55:539-552.

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

Bar-Joseph M & Loebenstein G. 1973. Effects of strain, source plant, and temperature on the transmissibility of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopatol* 63:716-720.

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

Benítez-Galeano MJ, 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, doi: 10.3390/v7072814.

Benítez-Galeano MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G, Colina R. **2018**. Complete genome sequence of a novel recombinant *Citrus tristeza virus*, a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announc* 6:e00442-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00442-18>.

Benítez-Galeano MJ, Hernández-Rodríguez L, Dalmao F, Bertoni E, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Maeso D, Colina R. **2021**. First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay. *Journal of Citrus Pathology*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.5070/C481049181>

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.

Bolger AM, Lohse M & Usadel B. **2014**. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170

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

Broadbent P, Brlansky RH, Indsto J. **1996**. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of sub-isolates by single aphid transmissions. *Plant Dis*. 80:329-333.

Calavan EC, Harjung MK, Blue RL, Roistacher CN, Gumpf DJ & Moore PW. **1980**. Natural spread of seedling yellows and sweet orange and grapefruit stem pitting tristeza viruses at the University of California, Riverside. En: *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV pp. 69-75. Permalink: <https://escholarship.org/uc/item/17g59647>

Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, Land SJ, Lu X, Ruden DM. **2012**. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. Apr-Jun;6(2):80-92.

Domingo E & Holland JJ. **1997**. RNA virus mutations and fitness survival. *Ann Rev Microbiol*. 51:151-178.

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

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.

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

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

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

Garnsey SM, Barrett HC & Hutchison DJ. **1987**. Identification of Citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19, 187-191.

Gowda S, Satyanarayana T, Davis CL, Navas-Castillo J, Albiach-Martí MR, Mawassi M, Valkov N, Bar-Joseph M, Moreno P, Dawson WO. **2000**. The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology*. 274(2):246-254. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0413>

Hall TA. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*41:95-98.

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

Hernández-Rodríguez L, Benítez-Galeano MJ, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Arruabarrena A, Rolón R, Colina R & Maeso D. **2019**. Diversity of Uruguayan Citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology*, 44:352- 362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>

Hilf ME, Karasev AV, Pappu HR, Gumpf DJ, Niblett CL, Garnsey SM. **1995**. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissues. *Virology*. 208(2):576-582. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1188>

Huson DH & Bryant D. **2006**. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies, *Mol. Biol. Evol.*, 23(2):254-267.

Kalyanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS. **2017**. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, 14:587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>

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

Knyazev S, Tsyvina V, Shankar A, Melnyk A, Artyomenko A, Malygina T, Porozov YB, Campbell EM, Switzer WM, Skums P, Mangul S, Zelikovsky A. **2021**. Accurate assembly of minority viral haplotypes from next-generation sequencing through efficient noise reduction. *Nucleic Acids Res.* Jul 2:gkab576. doi: 10.1093/nar/gkab576.

Kong P, Rubio L, Polek ML, Falk BW. **2000**. Population structure and genetic diversity within California citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes*. 21, 139-145

Langmead B & Salzberg SL. **2012**. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, 9, 357-359.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, Ingersoll R, Sheppard HW, Ray SC. **1999**. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* 73:152-160.

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

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

Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. **2015**. RDP4: detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol* 1:vev003. <https://doi.org/10.1093/ve/vev003>.

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

Navas-Castillo J, Albiachi-Martí MR, Gowda S, Hilf ME, Garnsey SM, Dawson WO. **1997**. Kinetics of accumulation of citrus tristeza virus RNAs. *Virology*. 228(1):92-97. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.8369>

Nguyen L-T, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. **2015**. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 32:268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>

Nolasco G, Fonseca F, Silva G. **2008**. Occurrence of genetic bottlenecks during citrus tristeza virus acquisition by *Toxoptera citricida* under field conditions. *Arch Virol*. 153: 259-271. doi: 10.1007/s00705-007-1089-8

Roistacher CN, da Graça JV & Müller GW. **1987**. Transmission of *Citrus Tristeza Virus* by *Aphis gossypii* reflecting changes in virus transmissibility in California. En: *Proceedings of the Eighth Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV pp. 76-82. Permalink: <https://escholarship.org/uc/item/3w7436tq>

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

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

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

Rubio L, Bertalmío A, Hernández-Rodríguez L, Benítez-Galeano MJ, Arruabarrena A, Rivas F, Colina R & Maeso D. **2019**. Biological and molecular characterization of Uruguayan citrus tristeza virus field isolates. *Journal of Plant Pathology*. 101:97-105.

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

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

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

Scott KA, 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. *Arch Virol*. 158,27-37

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

Wilm A, Poh Kim Aw P, Bertrand D, Hui Ting Yeo G, Ong SH, Wong CH, Khor CC, Petric R, Hibberd ML, Nagarajan N. **2012**. LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res*. 40(22):1189-201.

Yokomi RK, Saponari M, Sieburth PJ. **2010**. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of citrus tristeza virus by real-time reverse-transcription-polymerase chain reaction assays. *Virology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-4-0319>

Zhou Y, Zhou CY, Liu KH, Liu YQ, Wang XF. **2011**. Influence of the quantity and variability of citrus tristeza virus on transmissibility by single *Toxoptera citricida*. *J Plant Pathol*. 93(1):97-103.

#### 4. DISCUSIÓN GENERAL

Los cítricos son uno de los cultivos frutales más importantes a nivel económico en el mundo (Moreno *et al.*, 2008; Roistacher, 2010), y en Uruguay, es un rubro con un fuerte impacto socio-económico y constituye un sector exportador en expansión (Anuario OPYPA 2020). Como se mencionó previamente, este cultivo es susceptible a patógenos transmitidos por insectos e injertos de material vegetal infectado, y requiere medidas eficientes de manejo y control de enfermedades para permanecer competitivo en el mercado internacional.

El sector cítrico nacional posee una potencialidad productiva muy superior a la actual. Sin embargo, la presencia de ciertos patógenos en el país generan pérdidas anuales millonarias, las cuales utilizando tecnologías desarrolladas a nivel nacional e investigando en nuevas alternativas de control, promueven una mejora sustantiva en los niveles de producción. Cabe destacar que la continua demanda del mercado mundial por nuevas variedades ha propiciado la utilización masiva en el país del cambio de copa como medida rápida de sustitución varietal en quintas añosas, pero para que funcione a largo plazo debe ser realizado solamente en árboles sanos (Albrecht *et al.*, 2017). De aquí se desprende la importancia de la vigilancia continua de patógenos en el cultivo y la utilización de material certificado libre de virus derivado del PNSCC.

Por lo previamente expuesto, el objetivo de esta tesis fue establecer, por primera vez a nivel nacional, el estado de situación de las quintas cítricas respecto a tres virus y cinco viroides que afectan este cultivo. También, caracterizar desde el punto de vista biológico, molecular y evolutivo, subaislados de un aislado de campo de CTV, con el fin último de ser utilizado en un futuro programa de protección cruzada (CP).

En cuanto a la incidencia de los patógenos analizados, reportamos la presencia de los virus CTV (93,3%) y CPsV (45%), así como los viroides HSVd (3,6%) y CDVd (15,6%). CEVd fue detectado solamente en una de las 1175 muestras analizadas mientras que el virus SDV y los viroides CBLVd y CBCVd no fueron detectados (Benítez-Galeano *et al.*, 2021).

Para comprender la situación aquí descrita debemos entender el escenario histórico multicausal que puede haber llevado al desarrollo de la misma. En una

revisión realizada por Roistacher (2010) se detalla que en 1930 se habrían importado distintas variedades de cítricos desde Sudáfrica, siendo esta la evidencia más antigua con la que se cuenta del movimiento transoceánico de material vegetal hacia Sudamérica. El cambio en el uso de patrones en el tiempo debido a la aparición de distintas enfermedades, la falta de conocimiento del estado sanitario del material vegetal utilizado, la presencia ampliamente distribuida del vector *T. citricida* y la ausencia de un PNSCC, produjeron el escenario ideal para la diseminación de virus y viroides en cítricos.

La presencia en Uruguay de CTV, CPsV y los viroides HSVd, CEVd, CDVd y CBLVd había sido previamente reportada (Tucci *et al.*, 1965; Pagliano *et al.*, 1998, 2013) con incidencias superiores a las reportadas por nuestro grupo (Benítez-Galeano *et al.*, 2021). La disminución en la incidencia de los viroides podría deberse a los beneficios sanitarios del PNSCC, de liberar material saneado a campo de manera obligatoria desde 2014, y a buenos planes de manejo del cultivo en las distintas quintas, ya que son organismos que se transmiten mediante herramientas de corte o material vegetal infectado. Sin embargo, para los virus CTV y CPsV, la situación es un poco diferente debido a la biología de los organismos. Luego de la destrucción de árboles en las quintas cítricas de Uruguay causada por la Tristeza en los años 40, se observó un incremento en la incidencia y severidad de la enfermedad causada por CPsV (Tucci *et al.*, 1965). Teniendo en cuenta que la presente tesis reporta el primer estudio cuantitativo de CPsV, podemos asumir que la diseminación del virus puede haber sido causada por el uso masivo de material vegetal infectado, ya que el desarrollo de sintomatología causada por este virus puede demorar años, provocando su diseminación silenciosa por parte del productor (Tucci *et al.*, 1965; Benítez-Galeano *et al.*, 2021). También, por la elevada incidencia del virus aquí descrita, de manera individual o en co-infección con CTV, la diseminación de este patógeno podría deberse, como ha sido sugerido previamente, a la presencia de un vector natural del virus, aunque hasta el momento no ha sido reportado (Pujol & Beñatena 1965; Campiglia *et al.*, 1976; Timmer & Garnsey, 1980; García *et al.*, 2017; Hernández-Rodríguez *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020).

En cuanto a CTV, su elevada incidencia puede ser explicada por un lado, por la presencia del insecto vector más eficiente, porque aunque se utilice material libre del virus en el campo, la continua exposición de los cultivos al vector favorece la infección y re infección de los árboles. Por otro lado, la ingente variabilidad genética del virus, los frecuentes eventos de recombinación y la estructura de las poblaciones virales en cuasiespecies, pueden ser factores que favorezcan el *fitness* de ciertos genotipos del virus en las distintas variedades cítricas.

Los análisis filogenéticos basados en el gen de la cápside de CTV, reportaron la presencia de 5 de los 8 genotipos descritos al momento, siendo el HA16-5 el más prevalente. Mediante estudios de coalescencia y filogeografía pudimos establecer el tMRCA del genotipo y reconstruir la dinámica geográfica desde el origen hasta su primer ingreso al país (Benítez-Galeano *et al.*, 2017). También establecimos un segundo ingreso a Uruguay seguido de una expansión local, resultados que concuerdan con la hipótesis de emergencia de una nueva variante (Benítez-Galeano *et al.*, 2017).

Con estos resultados en mente, nos propusimos caracterizar este genotipo, tan prevalente en Uruguay, con el objetivo de ser utilizado en un programa de PC. Como se reportó previamente, el aislado pre inmunizador para la PC debe ser del mismo genotipo que se quiere controlar, y para que el efecto sea duradero no deben existir variantes minoritarias de otro genotipo en el aislado ya que pueden quebrar la resistencia como sucedió en Sudáfrica con el aislado GFMS12 utilizado desde 1984 (Folimonova, 2013; Scott *et al.*, 2013; Zablocki & Pietersen, 2014). Sin embargo, al analizar los genomas completos de los 3 subaislados del aislado madre DSST, aparentemente perteneciente al genotipo HA16-5, observamos que se trataba de genomas recombinantes del genotipo RB (Benítez-Galeano *et al.*, 2018). Estos resultados refuerzan la sugerencia de utilizar genomas completos de CTV para su caracterización en lugar de regiones parciales del genoma (Harper, 2013).

Como se ha descrito previamente, la organización poblacional de CTV está dividida en dos niveles de complejidad, uno que incluye las cepas o genotipos existentes en la población, como se discutió previamente, y otro relacionado con las variantes de secuencias minoritarias en torno a la secuencia maestra o mayoritaria (Harper *et al.*, 2015). Es sabido que las secuencias minoritarias pueden ser importantes en la

manifestación de síntomas de una enfermedad, a pesar de que se encuentren en baja proporción (Cerni *et al.*, 2008). Nuestros resultados concuerdan con lo antedicho para el caso del subaislado DSST 13 que presentó la co infección RB/VT y generó sintomatología más severa en las plantas indicadoras que los subaislados infectados solamente con el genotipo RB. Claramente ocurre una sinergia entre genotipos que podría explicar este aumento de síntomas, que puede ser explicada por la diversidad genética del espacio de secuencia de la cuasiespecie como se observa en la red de haplotipos. Al analizar los cambios nucleotídicos también observamos una mayor presencia de SNPs en DSST 13, dada por los *reads* compartidos entre genotipos, aunque mayormente sinónimos. Esto tiene sentido si pensamos en el mecanismo de transcripción/traducción de la mitad 3' del genoma de CTV, y en la presencia de distintos tipos de RNAs producidos durante el ciclo replicativo del virus.

Podemos concluir que la situación de la citricultura del Uruguay es compleja respecto a los patógenos aquí analizados, ya que por un lado encontramos plantas con co infecciones de varios de ellos, y en otro nivel, encontramos que los aislados de campo de CTV presentan poblaciones heterogéneas que podrían complicar la obtención de aislados protectores homogéneos para utilizar en la protección cruzada.



## 5. BIBLIOGRAFIA GLOBAL

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

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

Albrecht U, Zekri M & Williamson J. **2017**. Citrus Propagation. University of Florida IFAS Extension (<http://edis.ifas.ufl.edu>), publication HS1309.

Anuario OPYPA **2020**.  
(<https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/anuario2020/anuario2020.pdf>)

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

Bar-Joseph M & Mawassi M. **2013**. The defective RNAs of Closteroviridae. *Front Microbiol*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00132>

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

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

Barthe GA, Ceccardi TL, Keremane L, Manjunath L & Derrick KS. **1998**. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *J Gen Virol* 79: 1531-1537.

Belabess Z, Sagouti T, Rhallabi N, Tahiri A, Massart S, Tahzima R, Lahlali & Jijakli H. **2020**. Citrus psorosis virus: Current insights on a still poorly understood Ophiovirus. *Microorganisms*. 8, 1197; doi:10.3390/microorganisms8081197.

Beñatena HN & Portillo MM. **1984**. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, eds. *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV, 159-64.

Benítez-Galeano MJ, Castells M, Colina R. **2017**. The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the NC lineage of citrus tristeza virus. *Viruses*. 9,272. doi:10.3390/v9100272

Benítez-Galeano MJ, Hernández-Rodríguez L, Dalmao F, Bertoni E, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Maeso D, Colina R. **2021**. First comprehensive sanitary report of citrus-

infecting viruses and viroids in Uruguay. *Journal of Citrus Pathology*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.5070/C481049181>

Benítez-Galeano MJ, 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, doi: 10.3390/v7072814.

Benítez-Galeano MJ, Vallet T, Carrau L, Hernández-Rodríguez L, Bertalmío A, Rivas F, Rubio L, Maeso D, Vignuzzi M, Moratorio G, Colina R. **2018**. Complete genome sequence of a novel recombinant *Citrus tristeza virus*, a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announc* 6:e00442-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00442-18>.

Bernad L & Durán-Vila N. **2006**. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes* 20: 105-113.

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

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

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

Campiglia HG, Silveira CM & Salibe AA. **1976**. Psorosis transmission through seeds of trifoliolate orange. In: *Proceeding of the 7th Conference of the International Organization of Citrus Virology*. IOCV, Riverside. pp. 132-134.

Chambers GA, Donovan NJ, Bodaghi S, Jelinek SM, Vidalakis G. **2018**. A novel citrus viroid found in Australia, tentatively named Citrus viroid VII. *Arch Virol*. 163(1):215-218. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3591-y>.

Černi S, Ruščić J, Nolasco G, Gatin Ž, Krajačić M & Škorić D. **2008**. Stem pitting and seedling yellows symptoms of citrus tristeza virus infection may be determined by minor sequence variants. *Virus Genes*. 36, 241-249.

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

Danos V. **1990**. La psorosis de los cítricos, la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. *RIA-Revista de investigaciones agropecuarias-INTA (Buenos Aires-Argentina)*. v. 22(1) p.265-277

Diener TO. **1971**. "A plant virus with properties of a free nucleic acid: potato spindle tuber viroid," in *Comparative Virology*, eds K. Maramorosch and E. Kurstak (New York: Academic Press), 433-478.

Diener TO. **2003**. Discovering viroids: a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 75-80.

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

Durán-Vila N & Semancik JS. **2003**. Citrus viroids. pp. 178-194. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20033106013>

Fawcett HS. **1933**. New symptoms of psorosis indicating a virus disease of citrus. *Phytopathol.*, 23: 930.

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

Flores R, Hernandez C, Martinez de Alba A, Darós J & Di Serio F. **2005**. Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology* 43:117-139.

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

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

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

García ML, Dal Bó E, da Graça JV, Gago-Zachert S, Hammond J, Moreno P, Natsuaki T, Pallás V, Navarro JA, Reyes CA, et al. **2017**. ICTV virus taxonomy profile: Ophioviridae. *J. Gen. Virol.* 98,1161-1162.

García ML, Grau O & Sarachu AN. **1991**. Citrus psorosis is probably caused by a Bipartite ssRNA virus. *Res Virol* 142: 303-311.

Ghazal SA, El-Douqdouq KhA, Mousa AA, Fahmy H & Sofy AR. **2008**. Isolation and identification of citrus psorosis virus Egyptian isolate (CPsV-EG). *Commun Agric Appl Biol Sci.* 73(2): 285-95.

Gowda S, Satyanarayana T, Ayllón MA, Albiachi-Martí MR, Mawassi M, Rabindran S, Garnsey SM & Dawson WO. **2001**. Characterization of the cis-acting elements controlling subgenomic mRNAs of Citrus tristeza virus: Production of positive- and negative-stranded 3'-terminal and positive-stranded 5'-terminal RNAs. *Virology* 286, 134-151.

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

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

Hernández-Rodríguez L, Benítez-Galeano MJ, Bertalmío A, Rubio L, Rivas F, Arruabarrena A, Rolón R, Colina R & Maeso D. **2019**. Diversity of Uruguayan Citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology*, 44:352- 362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>

Hernandez-Rodriguez L, Bertalmio A, Rubio L, Roque R, Maeso D & Rivas F. **2020**. Inability of the brown citrus aphid (*Toxoptera citricida*) to transmit citrus psorosis virus under controlled conditions. *Journal of Citrus Pathology*, 7(1).

Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, *et al.* **2002**. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*. 92(5):542-547. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.542> PMID: 18943029.

Iwanami T, Kondo Y, Karasev A. **1999**. Nucleotide sequences and taxonomy of satsuma dwarf virus. *J Gen Virol*. 80(3). <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-3-793>

Iwanami T. 2010. Properties and control of Satsuma dwarf virus. *JARQ*. 44(1), 1-6.

Iwanami T, Koizumi M, Timmer LW, Garnsey SM & Graham JH. **2000**. Compendium of citrus diseases. APS press, St Paul. MN, USA. 59-60.

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

Malfitano M, Barone M, Durán-Vila N & Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 87: 115-121.

Martín S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, García ML, Grau O, Guerri J & Moreno P. **2004**. Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur J Plant Pathol*.

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

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

Moreno P, Guerri J & García ML. **2015**. The psorosis disease of citrus: A pale light at the end of the tunnel. *J Citrus Pathol.* 2, 1–18.

Naum-Ongania G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O & García ML. **2003**. Citrus Psorosis virus RNA<sub>1</sub> is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res* 96: 49-61.

Owens RA. **2008**. Viroids. In: Roossinck MJ (ed) *Plant virus evolution*. Springer, Berlin, pp 83–108.

Pagliano G, Orlando L & Gravina A. **1998**. Detección y caracterización del complejo de viroides de los cítricos en Uruguay. *Agrociencia*. Vol 11. No 1. pag 74-83.

Pagliano G, Peyrou M, Del Campo R, Orlando L, Gravina A, Wettstein R & Francis M. **2000**. Detection and characterization of citrus viroids in Uruguay. In: Yokomi RK, da Graça JV & Lee RF (eds.). *Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 282-288.

Pagliano G, Umaña R, Pritsch C, Rivas F & Durán-Vila N. **2013**. Occurrence, prevalence and distribution of citrus viroids in Uruguay. *Journal of Plant Pathology*. 95(3):631-635.

Palacio-BielsaA, Romero-Durbán J, Durán-Vila N. **2004**. Characterization of citrus HSVd isolates. *Archives of Virology*. 149, 537-552.

Plata MI, Costa N, Fabiani A & Anderson C. **2002**. Characterization of nine sources of dwarfing factors used in tree size control trials at Concordia, Argentina. In: Durán-Vila N, Milne RG & De Graça JV (Eds.). *Proceedings XV Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA. pp. 395-397.

Puchta H, Ramm K, Luckinger R, Hadas R, Bar-Joseph m, Snger HL. **1991**. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res*. 19(23):6640. doi: [10.1093/nar/19.23.6640](https://doi.org/10.1093/nar/19.23.6640)

Pujol AR & Beñatena HN. **1965**. Study of psorosis in Concordia, Argentina In: *Proceedings of the 3th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, IOCV (ed. W.C. Price). University of California, Riverside, CA, USA. pp. 170-179.

Ragozzino E, Faggioli F, Barba M. **2004**. Development of a one tube-one step RT-PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid. *J Virol Methods*. 121:25–9.

Reanwarakorn K & Semancik JS. **1998**. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid related group II citrus viroids. *J Gen Virol*. 79:3163-71

Reanwarakorn K & Semancik JS. **1999**. Correlation of Hop Stunt Viroid variants to Cachexia and Xyloporosis disease of citrus. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHTO.1999.89.7.568>

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

Roistacher CN, Blue RL; Calavan EC. **1973**. A new test for citrus cachexia. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19730310859>

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

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

Roistacher CN. **1993**. Psorosis: A Review. En: 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA: IOCV pp. 139-154.

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

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.

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

Sánchez de la Torre E, Riva O, Zandomeni R, Grau O & García ML. **1998**. The top component of citrus ringspot virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Mol Plant Pathol On-line* <http://194.247.68.33/mppol/1998/1019sanchez/>

Sanfaçon H, Wellink J, Le Gall O, Karasev A, van der Vlugt R, Wetzel T. **2009**. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Arch Virol*. 154, 899-907.

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

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

Scott KA, 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. *Arch Virol*. 158,27-37

Semancik JS & Vidalakis G. **2005**. The question of Citrus viroid IV as a Cocadviroid. *Arch Virol*. 150(6):1059-1067. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0499-8>.

Semancik JS & Weathers LG. **1972**. Exocortis virus: an infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology* 46:456-66.

Semancik JS, Roistacher CN, Rivera-Bustamante R & Durán-Vila N. **1988**. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J Gen Virol* 69:3059-68.

Serra P, Barbosa CJ, Daròs JA, Flores R & Durán-Vila N. **2008**. Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus Apscaviroid. *Virology*. 370(1):102-112. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.033>

Timmer LW & Garnsey SM. **1980**. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW, eds. *Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA, USA: IOCV, 167-93.

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

Tucci JC, Quintela RD & Mousques RP. **1965**. Virus diseases in Salto (Uruguay) In: *3d Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. IOCV pp. 220-222.

Velázquez K, Pina JA, Navarro L, Moremo P & Guerri J. **2012**. Association of citrus psorosis B symptoms with a sequence variant of the Citrus Psorosis virus RNA 2. *Plant Pathol*. 61, 448-456 doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02525.x

Vernière C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C, Bové JM & Durán-Vila N. **2004**. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Dis*. 88:1189-1197.

Vernière C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C, *et al.* **2006**. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology*. 96(4):356-368. <https://doi.org/10.1094/PHTO-96-0356>.

Vidalakis G, Pagliaccia D, Bash JA, Afunian M, Semancik JS. **2011**. Citrus dwarfing viroid: effects on tree size and scion performance specific to *Poncirus trifoliata* rootstock for high-density planting. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2010.00454.x>

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

Yamada S & Sawamura K. **1952**. Studies on the dwarf disease of Satsuma orange, Citrus unshiu Marcovitch. National Tokai-kinki Agr Exp. Sta., Hort. Div. Bull.

Yang X, Hadidi A, Garnsey SM. **1992**. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology*; 82:279–85.

Yokomi R, Selvaraj V, Maheshwari Y, Chiumenti M, Saponari M, Giampetruzzi A, Weng Z, Xiong Z & Hajeri S. **2018**. Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. *Archives of Virology* 163:1795-1804.

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

Zablocki O & Pietersen G. **2014**. Characterization of a novel citrus tristeza virus genotype within three cross-protecting source GFMS12 sub-isolates in South Africa by means of Illumina sequencing. *Arch Virol*. 159, 2133-2139.

Zanek MC, Peña E, Reyes CA, Fifueroa J, Stein B, Grau O & García ML. **2006**. Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using and improved TAS-ELISA. *J Virol Methods*. 137(2):245-51.

Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L & García ML. **2008**. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep*. 27(1): 57-66.

Zhou C, da Graça JV, Freitas-Astúa J, Vidalakis G, Durán-Vila N & Lavagi I. **2020**. Citrus viruses and viroids. In *The Genus Citrus* (pp. 391-410). Woodhead Publishing.



## 6. PERSPECTIVAS

- Continuar con la vigilancia epidemiológica de los patógenos estudiados.
- Analizar la dinámica poblacional de los subaislados DSST-13 y DSST-17 en el tiempo (6 y 12 meses post inoculación) y en dos hospederos diferentes (LM y PD).
- Analizar el uso de codones de CTV respecto al hospedero.
- Analizar el efecto a nivel de hospedero del cambio no sinónimo compartido entre los sub aislados DSST 17 y 25, así como de los cambios no sinónimos generados por los reads compartidos del subaislado co infectado DSST-13.

## 7. ARTÍCULOS EN COLABORACIÓN VINCULADOS CON CTV

### 7.1. Hernández-Rodríguez *et al.* 2017\_ First report of the CTV trifoliolate RB genotype in 'Newhall' sweet orange in South America

Page 1 of 2

First report of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in 'New Hall' sweet orange in South America

L. Hernández-Rodríguez\*, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, P.O. Box 11 300, 7<sup>th</sup> Ave., # 3005, Playa, Havana City, Cuba; A. Bertalmío, L. Rubio, A. Arruabarrena, D. Maeso and F. Rivas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, CP50000, Salto, Uruguay; M. J. Benítez-Galeano, R. Colina, Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, Rivera 1350, CP50000 Salto, Uruguay.

*Citrus tristeza virus* (CTV) (*Closteroviridae: Closterovirus*) has multiple isolates classified into six major CTV genotype groups or strains: T36, VT, T3, RB, T68, and T30 (Harper, 2013). The reported circulating strains in Uruguay are VT, T3, T36, and NC, a new genetic lineage (Benítez-Galeano *et al.*, 2015). To continue surveying CTV genotypes in Uruguay, single aphid (*Toxoptera citricida*) transmission (SAT) was performed to separate the virus population mixtures of several field isolates as described by Powell and Lin (2005). SAT was conducted by inoculating field isolates in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*), challenging 28 plants per field isolate. CTV infection was confirmed by ELISA with 3DF1+3CA5 and MCA13 antibodies (PlantPrint Diagnostics), and RNA silencing suppressor genes p20 and p25 were amplified by RT-PCR (Benítez-Galeano *et al.*, 2015). In 2015, nine sub-isolates were obtained by SAT from a field isolate named SNH-A, which was collected from a 23-year-old asymptomatic 'New Hall' sweet orange (*C. sinensis*) grafted onto *Poncirus trifoliata* in a commercial orchard at Paysandú, Uruguay, in January, 2014. CTV was detected in one of these sub-isolates (SNH-9-sA) by 3DF1+3CA5 and MCA13 antibodies 30 days after SAT. RNA was extracted as recommended in Arruabarrena *et al.* (2015), and fragments with expected sizes of 561 and 677 bp were amplified after retrotranscription for the p20 and p25 genes, respectively. When comparing p20 and p25 sequences of SNH-A (KU928185, KU900357) and SNH-9-sA (KU928185, KU900356) with each other the nucleotide identities were 94.5 and 93.5% respectively. These sequences also showed nucleotide identities ranging from 91 to 98% with reference isolates of the CTV strains (T36: AY340974, U16304, VT: EU857538, T3: KC525952, RB: FJ525431, T68: JQ965119, T30: AF260651, Y18420 and NC: GQ454870). The highest nucleotide identity for the two analyzed genes of SNH-9-sA sequences was with the resistance-breaking RB strain, and for SNH-A sequences with T3 (p20) and NC (p25) strains. The RB phenotype of sub-isolate SNH-9-sA was demonstrated by grafting three bark patches onto three *P. trifoliata* seedlings (rutaceous species where only RB strains can systemically move to cause an infection, Dawson and Mooney, 2000). One of the three SNH-9-sA inoculated plants (SNH-9-sA-Tp3) was 3DF1+3CA5 and MCA13 positive eight months after graft-inoculation. Amplicons for the p20 and p25 genes were amplified and the corresponding sequences (KY559506, KY367397) showed the highest nucleotide identity with the RB strain. Maximum Likelihood phylogenetic trees of the two genes grouped the SNH-9-sA, SNH-9-sA-Tp3 and RB strains sequences in the same phylogenetic cluster, while SNH-A was grouped in different clades depending on the analyzed gene (e-Xtra). To our knowledge, this is the first report of the presence of the CTV RB genotype in South America. Taking into consideration the widespread use of *P. trifoliata* as rootstock in Uruguay, the described findings highlight the urgent need to study the epidemiology of the RB genotype in the country, and enforce management strategies that consider the presence of this genotype for the implementation of control measures.

#### References:

- A. Arruabarrena *et al.* J. Virol. Methods 237:14–17, 2016.
- M. J. Benítez-Galeano *et al.* Viruses 7:4152–4168, 2015.
- T. E. Dawson and P.A. Mooney. Proc. of the 14<sup>th</sup> IOCV: 69–76, 2000.
- S. J. Harper. Front. Microbiol. 4: e93, 2013.
- C. A. Powell and Y. Lin. HORTSCIENCE 40(3):694–696, 2005.

## 7.2. Rubio *et al.* 2019\_ Biological and molecular characterization of Uruguayan CTV field isolates

Journal of Plant Pathology  
<https://doi.org/10.1007/s42161-018-0149-0>

ORIGINAL ARTICLE



### Biological and molecular characterization of Uruguayan citrus tristeza virus field isolates

Leticia Rubio<sup>1</sup>  · Ana Bertalmío<sup>1</sup> · Lester Hernández-Rodríguez<sup>1</sup> · María José Benítez Galeano<sup>2</sup> · Ana Arruabarrena<sup>1</sup> · Fernando Rivas<sup>1</sup> · Rodney Colina<sup>2</sup> · Diego Maeso<sup>1</sup>

Received: 6 June 2018 / Accepted: 29 July 2018  
© Società Italiana di Patologia Vegetale (S.I.Pa.V.) 2018

#### Abstract

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of the most important viral disease of citrus. Symptoms that may affect the productive potential of citrus plants are observed in Uruguayan orchards even though resistant rootstocks are used. CTV is fully eliminated in propagative materials by the National Sanitation and Certification Program, but since the virus and its vector are widespread in the country, the risk of infection in the field persists. In this situation, using mild CTV strains in a cross-protection program would be a useful alternative to attempt to increase yield and quality of the local citrus industry. To this aim, this study assessed the biological and molecular characteristics of 32 local CTV isolates. Bioassays were conducted in a greenhouse with controlled conditions. Each isolate was graft-inoculated on Mexican lime, sweet orange, sour orange and Duncan grapefruit indicator plants. Symptoms and their intensity were evaluated. Molecular characterization was carried out by RT-PCR amplification, using primers for the p25, p20 and p23 genes. PCR products were sequenced, nucleotide sequences were aligned with international reference strains and phylogenetic trees were constructed. Results of the biological and molecular analysis showed the prevalence of severe CTV isolates with a high genetic variability. Two out of 32 characterized isolates were selected as mild CTV isolates to be tested as candidates for future cross-protection experiments. The survey showed a complex scenario for the management of CTV in Uruguay.

**Keywords** *Closterovirus* · *Closteroviridae* · CTV · Biological indexing · Phylogenetic analysis

### 7.3. Llanes-Alvarez *et al.* 2021\_Prevalence of mild CTV isolates of the T30 genotype in Cuban commercial citrus fields after the dissemination of HLB



## Prevalence of mild citrus tristeza virus isolates of the T30 genotype in Cuban commercial citrus fields after the dissemination of huanglongbing

Yilian Llanes-Alvarez <sup>a</sup>, Inés Peña-Bárcaga <sup>a</sup>, Lochy Batista-Le Riverend <sup>a</sup>, Ronal Pacheco <sup>a, b</sup>, Victoria Zamora-Rodríguez <sup>a</sup>, María José Benítez-Galeano <sup>c, d</sup>, Fernando Rivas <sup>e</sup>, Ana Bertalmío <sup>e</sup>, Lester Hernández-Rodríguez <sup>a, \* 〇 〓</sup>

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105422>

Get rights and content

### Abstract

Huanglongbing (HLB) disease detection in Cuba in 2006 led to a turn in citrus management in the country, including the production of certified budwood in protected nurseries, eradication of symptomatic plants and old orchards, and chemical control of the vector *Diaphorina citri*. This dramatic shift in citrus farming could have affected the incidence and composition of citrus tristeza virus (CTV) populations. This work aimed to determine CTV incidence and characterize viral isolates from the main Cuban citrus-producing areas. A survey throughout the country was carried out which resulted in the collection of 27 CTV isolates. Results showed a decrease of CTV incidence in western and central areas of the country, but an increase in the East, compared to previous reports. Bioindexing showed that most of the isolates induced none or mild symptoms. Serological characterization using seven different CTV specific monoclonal antibodies (MAb) showed heterogeneity among the 27 isolates. Six out of twenty-seven were MCA13-reactive, a MAb associated to the presence of severe CTV isolates. Nevertheless, sequence comparison of the *p20*, *p23* and *p25* genes evidenced a high nucleotide sequence identity among isolates, and according to the phylogenetic analyses, all the sequences belonged to the CTV T30 genotype. Thus, our results showed a decrease in the CTV incidence in the surveyed areas and the broad dissemination of mild CTV isolates of the T30 genotype, which could be partially explained by the shift in the management programs implemented for CTV and HLB control in Cuba.

## 8. ARTÍCULOS NO RELACIONADOS CON LA TESIS

### 8.1. Mir *et al.* 2021\_ Recurrent dissemination of SARS-CoV-2 through the Uruguayan-Brazilian border



# Recurrent Dissemination of SARS-CoV-2 Through the Uruguayan–Brazilian Border

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Kai Huang,  
University of Texas Medical Branch,  
United States

**Reviewed by:**

Matthew M. Hernandez,  
Icahn School of Medicine at Mount  
Sinai, United States  
Piyush Bairdara,  
University of Missouri, United States  
Xiangding Deng,  
University of California,  
San Francisco, United States

**\*Correspondence:**

Lucía Spangenberg  
lucia@pasteur.edu.uy  
Rodney Colina  
rodneycolina1@gmail.com  
Gonzalo Bello  
gbelobr@gmail.com

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Virology,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

**Received:** 15 January 2021

**Accepted:** 08 April 2021

**Published:** 28 May 2021

**Citation:**

Mir D, Rego N, Resende PC,  
Tort F, Fernández-Calero T, Noya V,  
Brandes M, Possi T, Arleo M,  
Reyes N, Victoria M, Lizasoain A,  
Castells M, Maya L, Salvo M,  
Schäffer Gregianini T,  
Mar da Rosa MT, Garay Martins L,  
Alonso C, Vega Y, Salazar C, Ferrés I,  
Smircich P, Sotelo Silveira J, Fort RS,  
Mathó C, Arantes I, Appolinario L,  
Mendonça AC, Benitez-Galeano MJ,  
Simoões C, Graña M, Motta F,  
Siqueira MM, Bello G, Colina R and  
Spangenberg L (2021) Recurrent  
Dissemination of SARS-CoV-2  
Through the Uruguayan–Brazilian  
Border. *Front. Microbiol.* 12:653986.  
doi: 10.3389/fmicb.2021.653986

**Daiana Mir<sup>1†</sup>, Natalia Rego<sup>2†</sup>, Paola Cristina Resende<sup>3†</sup>, Fernando Tort<sup>4†</sup>,  
Tamara Fernández-Calero<sup>2,5†</sup>, Verónica Noya<sup>2,6</sup>, Mariana Brandes<sup>2</sup>, Tanía Possi<sup>6</sup>,  
Mailen Arleo<sup>6</sup>, Natalia Reyes<sup>6</sup>, Matías Victoria<sup>4</sup>, Andres Lizasoain<sup>4</sup>, Matías Castells<sup>4</sup>,  
Leticia Maya<sup>4</sup>, Matías Salvo<sup>4</sup>, Tatiana Schäffer Gregianini<sup>7</sup>,  
Marilda Tereza Mar da Rosa<sup>7</sup>, Leticia Garay Martins<sup>8</sup>, Cecilia Alonso<sup>9</sup>, Yasser Vega<sup>10</sup>,  
Cecilia Salazar<sup>11</sup>, Ignacio Ferrés<sup>11</sup>, Pablo Smircich<sup>12</sup>, Jose Sotelo Silveira<sup>13</sup>,  
Rafael Sebastián Fort<sup>12</sup>, Cecilia Mathó<sup>13</sup>, Ighor Arantes<sup>14</sup>, Luciana Appolinario<sup>3</sup>,  
Ana Carolina Mendonça<sup>3</sup>, María José Benítez-Galeano<sup>1</sup>, Camila Simoes<sup>2</sup>,  
Martín Graña<sup>2</sup>, Fernando Motta<sup>3</sup>, Marilda Mendonça Siqueira<sup>3</sup>, Gonzalo Bello<sup>14\*</sup>,  
Rodney Colina<sup>14\*</sup> and Lucía Spangenberg<sup>2,15\*</sup>**

<sup>1</sup> Unidad de Genómica y Bioinformática, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay, <sup>2</sup> Unidad de Bioinformática, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, <sup>3</sup> Laboratório de Virus Respiratórios e Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>4</sup> Laboratorio de Virología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Salto, Uruguay, <sup>5</sup> Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Católica del Uruguay, Montevideo, Uruguay, <sup>6</sup> Laboratorio de Biología Molecular, Sanatorio Americano, Montevideo, Uruguay, <sup>7</sup> Laboratório Central de Saúde Pública, Centro Estadual de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (LACEN/CEVS/SES-RS), Porto Alegre, Brazil, <sup>8</sup> Centro Estadual de Vigilância em Saúde da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, <sup>9</sup> CENUR Este-Sede Rocha-Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>10</sup> Laboratorio DILAVE/MGAP-INIA-Universidad de la República, Tacuarembó, Uruguay, <sup>11</sup> Laboratorio de Genómica Microbiana, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay, <sup>12</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>13</sup> Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, MEC, Sección Biología Celular, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, <sup>14</sup> Laboratorio de AIDS e Imunología Molecular, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>15</sup> Departamento de Informática y Ciencias de la Computación, Universidad Católica del Uruguay, Montevideo, Uruguay

Uruguay is one of the few countries in the Americas that successfully contained the coronavirus disease 19 (COVID-19) epidemic during the first half of 2020. Nevertheless, the intensive human mobility across the dry border with Brazil is a major challenge for public health authorities. We aimed to investigate the origin of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) strains detected in Uruguayan localities bordering Brazil as well as to measure the viral flux across this ~1,100 km uninterrupted dry frontier. Using complete SARS-CoV-2 genomes from the Uruguayan–Brazilian bordering region and phylogeographic analyses, we inferred the virus dissemination frequency between Brazil and Uruguay and characterized local outbreak dynamics during the first months (May–July) of the pandemic. Phylogenetic analyses revealed multiple introductions of SARS-CoV-2 Brazilian lineages B.1.1.28 and B.1.1.33 into Uruguayan localities at the bordering region. The most probable sources of viral strains introduced to Uruguay were the Southeast Brazilian region and the state of Rio Grande do Sul. Some of the viral strains introduced in Uruguayan border localities between early May and mid-July were able to locally spread and

## 8.2. Rego *et al.* 2021\_ Real-time genomic surveillance for SARS-CoV-2 variants of concern, Uruguay

### RESEARCH LETTERS

#### About the Author

Dr. Jayasinghearachchi is a senior lecturer at General Sir John Kotelawala Defense University, Ratmalana. Her research interests include molecular evolution of human pathogens and their epidemiology.

#### References

1. Corea EM, de Silva AD, Thevanesam V. Melioidosis in Sri Lanka. *Trop Med Infect Dis.* 2018;3:22. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed3010022>
2. Ko WC, Cheung BM, Tang HJ, Shih HL, Lau YJ, Wang LR, et al. Melioidosis outbreak after typhoon, southern Taiwan. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:896–8. <https://doi.org/10.3201/eid1306.060646>
3. Merritt A, Inglis TJ, Chidlow G, Hamett G. PCR-based identification of *Burkholderia pseudomallei*. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2006;48:239–44. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652006000500001>
4. Jayasinghearachchi HS, Corea EM, Krishnananthasivam S, Sathkumara HD, Francis VR, Abeysekere TR, et al. Whole-genome sequences of eight clinical isolates of *Burkholderia pseudomallei* from melioidosis patients in eastern Sri Lanka. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8:e00645–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00645-19>
5. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012;28:1166–7. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
6. Bertelli C, Laird MR, Williams KP, Lau BY, Hoad G, Winsor GL, et al.; Simon Fraser University Research Computing Group. IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W30–5. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>
7. Amdt D, Grant JR, Marcu A, Sajed T, Pon A, Liang Y, et al. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(W1):W16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw387>
8. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012;15:28(12):1647–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
9. Siththidat C, Stevens JM, Chantratita N, Currie BJ, Peacock SJ, Korbsrisate S, et al. Prevalence and sequence diversity of a factor required for actin-based motility in natural populations of *Burkholderia* species. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2418–22. <https://doi.org/10.1128/JCM.00368-08>
10. Holden MT, Titball RW, Peacock SJ, Cerdeño-Tárraga AM, Atkins T, Crossman LC, et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:14240–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403302101>

Address for correspondence: Enoka M. Corea, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, University of Colombo, Colombo, Sri Lanka; email: enokac@micro.cmb.ac.lk; Aruna D. De Silva, Department of Paraclinical Sciences, Faculty of Medicine, General Sir John Kotelawala Defense University, Ratmalana, Sri Lanka; email: dharshan\_fom@kdu.ac.lk

## Real-Time Genomic Surveillance for SARS-CoV-2 Variants of Concern, Uruguay

Natalia Rego,<sup>1</sup> Alicia Costáble,<sup>1</sup> Mercedes Paz,<sup>1</sup> Cecilia Salazar,<sup>1</sup> Paula Perbolianachis,<sup>1</sup> Lucía Spangenberg, Ignacio Ferrés, Rodrigo Arce, Alvaro Fajardo, Mailen Arleo, Tania Possi, Natalia Reyes, Ma Noel Bentancor, Andrés Lizasoain, María José Benítez, Viviana Bortagaray, Ana Moller, Gonzalo Bello, Ighor Arantes, Mariana Brandes, Pablo Smircich, Odhille Chappos, Melissa Duquía, Belén González, Luciana Grifféro, Mauricio Méndez, Ma Pía Techera, Juan Zanetti, Bernardina Rivera, Matías Maidana, Martina Alonso, Cecilia Alonso, Julio Medina, Henry Albornoz, Rodney Colina, Veronica Noya, Gregorio Iraola, Tamara Fernández-Calero, Gonzalo Moratorio, Pilar Moreno

Author affiliations: Institut Pasteur, Montevideo, Uruguay (N. Rego, A. Costáble, M. Paz, C. Salazar, P. Perbolianachis, L. Spangenberg, I. Ferrés, R. Arce, A. Fajardo, M. Brandes, B. Rivera, M. Maidana, M. Alonso, G. Iraola, T. Fernández-Calero, G. Moratorio, P. Moreno); Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (A. Costáble, P. Perbolianachis, R. Arce, A. Fajardo, A. Lizasoain, M.J. Benítez, V. Bortagaray, A. Moller, O. Chappos, M. Duquía, B. González, L. Grifféro, M. Méndez, M.P. Techera, J. Zanetti, C. Alonso, R. Colina, G. Moratorio, P. Moreno); Sanatorio Americano, Montevideo (M. Arleo, T. Possi, N. Reyes, M.N. Bentancor, V. Noya); Instituto Oswaldo Cruz–Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil (G. Bello, I. Arantes); Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo (P. Smirnich); Ministerio de Salud Pública, Montevideo (J. Medina, H. Albornoz)

DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2711.211198>

We developed a genomic surveillance program for real-time monitoring of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) variants of concern (VOCs) in Uruguay. We report on a PCR method for SARS-CoV-2 VOCs, the surveillance workflow, and multiple independent introductions and community transmission of the SARS-CoV-2 P.1 VOC in Uruguay.

By late 2020, because of natural viral evolution, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) genetic variants emerged, some of which show increased transmissibility and cause more severe coronavirus disease (COVID-19) (1). In

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

## ANEXO 1. Comandos utilizados en el análisis de datos de los subaislados DSST-13, -17 y -25.

```
#!/bin/bash
#####
#-----Análisis de calidad y trimming: FastQC y Trimmomatic-----
#####
for i in $(ls | grep fastq | rev | cut -c7- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    java -jar ~/bin/Trimmomatic-0.36/trimmomatic-0.36.jar SE -
threads 4 -phred33 -trimlog logfile $i.fastq
~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/$i-trimm SLIDINGWINDOW:3:20
HEADCROP:12 MINLEN:138 CROP:135
fastqc -f fastq ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/$i-trimm -o
~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/FastQCresults
done
#####
#-----Filtrado del hospedero: Mapeo a C. sinensis-----
#####
bowtie2-build ~/Escritorio/Majo/C.sinensis_genome/C.sinensis.fasta
~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/C.sinensis_ref
for i in $(ls | grep trimm | rev | cut -c7- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x C.sinensis_ref -U $i-trimm -S $i.sam
    samtools view -S -f4 $i.sam > $i-unmapped.sam
    cut -f1 $i-unmapped.sam | sort | uniq > $i-unmapped_ids.lst
    seqtk subseq ~/Escritorio/Majo/$i.fastq $i-unmapped_ids.lst >
$i-unmapped.fastq
done
#####
#-----Estimación de frecuencia de genotipos-----
#####
for i in $(ls | grep unmapped.fastq | rev | cut -c16- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2-build CTV_db_5_half.fasta CTV_db_5_half
    bowtie2 -p 4 -x CTV_db_5_half -U $i-unmapped.fastq -S $i-CTV-
db-5.sam
    samtools view -S -F4 $i-CTV-db-5.sam > $i-mapped-CTV-db-5.sam
    samtools view -bST CTV_db_5_half.fasta $i-mapped-CTV-db-5.sam
> $i-mapped-CTV-db-5.bam
    samtools sort -o $i-CTV-db-5-sorted.bam $i-mapped-CTV-db-5.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-CTV-db-5-sorted.bam > $i-CTV-db-5-
map_bam
    samtools index $i-CTV-db-5-map_bam $i-CTV-db-5-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-CTV-db-5-map_bam > $i-CTV-db-5-
map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-mapped-CTV-db-5.bam > $i-CTV-db-
5-coverage
    samtools index $i-CTV-db-5-sorted.bam $i-CTV-db-5-
sorted.bam.bai
    samtools bam2fq $i-mapped-CTV-db-5.bam > $i-CTV-db-5-
mapped.fastq
    rm $i-mapped-CTV-db-5.bam $i-mapped-CTV-db-5.sam $i-CTV-db-
5.sam
done
bowtie2-build MH186146_5_10881nt.fasta MH186146_5_db
bowtie2-build DSST_13_5_10844nt.fasta DSST_13_5_db
```

```

for i in $(ls | grep CTV-db-5-mapped.fastq | rev | cut -c23- | rev |
uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x MH186146_5_db -U $i-CTV-db-5-mapped.fastq -S
$i-mapped-freq-5-RB.sam
    samtools view -S -F4 $i-mapped-freq-5-RB.sam > $i-freq-5-RB.sam
    samtools view -bST MH186146_5_10881nt.fasta $i-freq-5-RB.sam >
$i-freq-5-RB.bam
    samtools sort -o $i-freq-5-RB-sorted.bam $i-freq-5-RB.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-freq-5-RB-sorted.bam > $i-freq-5-
RB-map_bam
    samtools index $i-freq-5-RB-map_bam $i-freq-5-RB-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-freq-5-RB-map_bam > $i-freq-5-RB-
map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-freq-5-RB.bam > $i-freq-5-RB-
coverage
    samtools index $i-freq-5-RB-sorted.bam $i-freq-5-RB-
sorted.bam.bai
    cut -f1 $i-freq-5-RB.sam | sort | uniq > $i-mapped-to-5-RB-
ids.lst
    bowtie2 -p 4 -x DSST_13_5_db -U $i-CTV-db-5-mapped.fastq -S $i-
mapped-freq-5-VT.sam
    samtools view -S -F4 $i-mapped-freq-5-VT.sam > $i-freq-5-VT.sam
    samtools view -bST DSST_13_5_10844nt.fasta $i-freq-5-VT.sam >
$i-freq-5-VT.bam
    samtools sort -o $i-freq-5-VT-sorted.bam $i-freq-5-VT.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-freq-5-VT-sorted.bam > $i-freq-5-
VT-map_bam
    samtools index $i-freq-5-VT-map_bam $i-freq-5-VT-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-freq-5-VT-map_bam > $i-freq-5-VT-
map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-freq-5-VT.bam > $i-freq-5-VT-
coverage
    samtools index $i-freq-5-VT-sorted.bam $i-freq-5-VT-
sorted.bam.bai
    cut -f1 $i-freq-5-VT.sam | sort | uniq > $i-mapped-to-5-VT-
ids.lst
    cat $i-mapped-to-5-VT-ids.lst $i-mapped-to-5-RB-ids.lst | sort
> $i-mapped-to-both
    uniq -D $i-mapped-to-both > $i-duplicates
    uniq -d $i-duplicates > $i-unique-shared-reads_ids.lst
    seqtk subseq $i-CTV-db-5-mapped.fastq $i-unique-shared-
reads_ids.lst > $i-compartido-VT-RB.fastq
    bowtie2 -p 4 -x MH186146_5_db -U $i-compartido-VT-RB.fastq -S
$i-mapped-compartido-5-vs-RB.sam
    samtools view -S -F4 $i-mapped-compartido-5-vs-RB.sam > $i-
compartido-5-vs-RB.sam
    samtools view -bST MH186146_5_10881nt.fasta $i-compartido-5-
vs-RB.sam > $i-compartido-5-vs-RB.bam
    samtools sort -o $i-compartido-5-vs-RB-sorted.bam $i-
compartido-5-vs-RB.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-compartido-5-vs-RB-sorted.bam > $i-
compartido-5-vs-RB-map_bam
    samtools index $i-compartido-5-vs-RB-map_bam $i-compartido-5-
vs-RB-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-compartido-5-vs-RB-map_bam > $i-
compartido-5-vs-RB-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-compartido-5-vs-RB.bam > $i-
compartido-5-vs-RB-coverage

```



```

    samtools index $i-compartido-5-vs-RB-sorted.bam $i-compartido-
5-vs-RB-sorted.bam.bai
    bowtie2 -p 4 -x DSST_13_5_db -U $i-compartido-VT-RB.fastq -S
$i-mapped-compartido-5-vs-VT.sam
    samtools view -S -F4 $i-mapped-compartido-5-vs-VT.sam > $i-
compartido-5-vs-VT.sam
    samtools view -bST DSST_13_5_10844nt.fasta $i-compartido-5-vs-
VT.sam > $i-compartido-5-vs-VT.bam
    samtools sort -o $i-compartido-5-vs-VT-sorted.bam $i-
compartido-5-vs-VT.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-compartido-5-vs-VT-sorted.bam > $i-
compartido-5-vs-VT-map_bam
    samtools index $i-compartido-5-vs-VT-map_bam $i-compartido-5-
vs-VT-map_bai
    samtools depth -d1000000 $i-compartido-5-vs-VT-map_bam > $i-
compartido-5-vs-VT-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-compartido-5-vs-VT.bam > $i-
compartido-5-vs-VT-coverage
    samtools index $i-compartido-5-vs-VT-sorted.bam $i-compartido-
5-vs-VT-sorted.bam.bai
done
#####
#-----Análisis y anotación de variantes genéticas-----
#####
##### MAPEO DE READS NO MAPEADOS CON C. SINENSIS A CTV-DB DE
GENOTIPOS CONSENSO #####
bowtie2-build cons_8_genot_CTV.fasta CTV_db
for i in $(ls | grep unmapped.fastq | rev | cut -c16- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x CTV_db -U $i-unmapped.fastq -S $i-CTV-db.sam
    samtools view -S -F4 $i-CTV-db.sam > $i-mapped-CTV-db.sam
    samtools view -bST cons_8_genot_CTV.fasta $i-mapped-CTV-db.sam
> $i-mapped-CTV-db.bam
    samtools sort -o $i-CTV-db-sorted.bam $i-mapped-CTV-db.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-CTV-db-sorted.bam > $i-CTV-db-
map_bam
    samtools index $i-CTV-db-map_bam $i-CTV-db-map_bai
    samtools depth -d1000000 $i-CTV-db-map_bam > $i-CTV-db-
map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-mapped-CTV-db.bam > $i-CTV-db-
coverage
    samtools index $i-CTV-db-sorted.bam $i-CTV-db-sorted.bam.bai
    samtools bam2fq $i-mapped-CTV-db.bam > $i-CTV-db-mapped.fastq
rm $i-mapped-CTV-db.bam $i-mapped-CTV-db.sam $i-CTV-db.sam
done
##### MAPEO DE READS NO MAPEADOS CON C. SINENSIS A GENOMAS
ENSAMBLADOS DE NOVO #####
bowtie2-build MH186146.fasta MH186146_ref
for i in $(ls | grep unmapped.fastq | rev | cut -c16- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x MH186146_ref -U $i-unmapped.fastq -S $i-RB.sam
    samtools view -S -F4 $i-RB.sam > $i-mapped-RB.sam

    samtools view -bST MH186146.fasta $i-mapped-RB.sam > $i-mapped-
RB.bam
    samtools sort -o $i-RB-sorted.bam $i-mapped-RB.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-RB-sorted.bam > $i-RB-map_bam
    samtools index $i-RB-map_bam $i-RB-map_bai
    samtools depth -d1000000 $i-RB-map_bam > $i-RB-map_depth.txt

```

```

samtools stats -c 1,1000,1 $i-mapped-RB.bam > $i-RB-coverage
samtools index $i-RB-sorted.bam $i-RB-sorted.bam.bai
samtools bam2fq $i-mapped-RB.bam > $i-RB-mapped.fastq
done
bowtie2-build DSST_13_VT_refseq.fasta DSST_13_VT_ref
bowtie2 -p 4 -x DSST_13_VT_ref -U DSST_13-unmapped.fastq -S DSST_13-
VT.sam
samtools view -S -F4 DSST_13-VT.sam > DSST_13-mapped-VT.sam
samtools view -bST DSST_13_VT_refseq.fasta DSST_13-mapped-VT.sam >
DSST_13-mapped-VT.bam
samtools sort -o DSST_13-VT-sorted.bam DSST_13-mapped-VT.bam
samtools view -h -F4 -b DSST_13-VT-sorted.bam > DSST_13-VT-map_bam
samtools index DSST_13-VT-map_bam DSST_13-VT-map.bai
samtools depth -d10000000 DSST_13-VT-map_bam > DSST_13-VT-
map_depth.txt
samtools stats -c 1,1000,1 DSST_13-mapped-VT.bam > DSST_13-VT-
coverage
samtools index DSST_13-VT-sorted.bam DSST_13-VT-sorted.bam.bai
samtools bam2fq DSST_13-mapped-VT.bam > DSST_13-VT-mapped.fastq
##### EXTRACCIÓN DE READS UNICOS Y COMPARTIDOS #####
#Para RB: (Lo opuesto se hizo para VT)
cut -f1 DSST_13-mapped-RB.sam | sort | uniq > DSST_13-mapped-RB-
ids.lst
samtools view -S -f4 DSST_13-RB.sam > DSST_13-unmapped-RB.sam
cut -f1 DSST_13-unmapped-RB.sam | sort | uniq > DSST_13-unmapped-RB-
ids.lst
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq DSST_13-unmapped-RB-ids.lst >
DSST_13-unmapped-RB.fastq
bowtie2 -p 4 -x DSST_13_VT_ref -U DSST_13-unmapped-RB.fastq -S 13-
unmapped-to-RB-mapped-VT.sam
samtools view -S -F4 13-unmapped-to-RB-mapped-VT.sam > 13-unm-RB-
map-VT.sam
cut -f1 13-unm-RB-map-VT.sam | sort | uniq > 13-unm-RB-map-VT-ids.lst
#Para VT:
cut -f1 DSST_13-mapped-VT.sam | sort | uniq > DSST_13-mapped-VT-
ids.lst
samtools view -S -f4 DSST_13-VT.sam > DSST_13-unmapped-VT.sam
cut -f1 DSST_13-unmapped-VT.sam | sort | uniq > DSST_13-unmapped-VT-
ids.lst
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq DSST_13-unmapped-VT-ids.lst >
DSST_13-unmapped-VT.fastq
bowtie2 -p 4 -x MH186146_ref -U DSST_13-unmapped-VT.fastq -S 13-
unmapped-to-VT-mapped-RB.sam
samtools view -S -F4 13-unmapped-to-VT-mapped-RB.sam > 13-unm-VT-
map-RB.sam
cut -f1 13-unm-VT-map-RB.sam | sort | uniq > 13-unm-VT-map-RB-ids.lst
#para comparar listas de reads mapeados a ambas ref-seq y obtener
reads compartidos:
cat DSST_13-mapped-VT-ids.lst DSST_13-mapped-RB-ids.lst | sort >
mapped-to-both
uniq -D mapped-to-both > duplicates
uniq -d duplicates > unique-shared-reads-ids.lst
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq unique-shared-reads-ids.lst > 13-
compartidos.fastq
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq 13-unm-VT-map-RB-ids.lst > 13-
unicos-RB.fastq
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq 13-unm-RB-map-VT-ids.lst > 13-
unicos-VT.fastq
##### ANALISIS CON DATASETS SIN READS COMPARTIDOS #####
bowtie2 -p4 -x CTV_db -U DSST_13-unmapped.fastq -S 13-mapeo-CTV-
db.sam

```

```

samtools view -S -F4 13-mapeo-CTV-db.sam > 13-mapeados-db.sam
cut -f1 13-mapeados-db.sam | sort | uniq > 13-mapeados-ids.lst
cat 13-mapeados-ids.lst unique-shared-reads-ids.lst | sort >
todosmasrepetidos
uniq -c todosmasrepetidos | sort | egrep '1 ' | cut -c9- > 13-
sinrepetidos-ids.lst
seqtk subseq DSST_13-trimm.fastq 13-sinrepetidos-ids.lst > 13-
sincompartidos.fastq
for i in $(ls | grep sincompartidos.fastq | rev | cut -c22- | rev |
uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x MH186146_ref -U $i-sincompartidos.fastq -S $i-
sincompartidos-mapped-RB.sam
    samtools view -S -F4 $i-sincompartidos-mapped-RB.sam > $i-
sincompartidos-vs-RB.sam
    samtools view -bST MH186146.fasta $i-sincompartidos-vs-RB.sam
> $i-sincompartidos-vs-RB.bam
    samtools sort -o $i-sincompartidos-vs-RB-sorted.bam $i-
sincompartidos-vs-RB.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-sincompartidos-vs-RB-sorted.bam >
$i-sincompartidos-vs-RB-map_bam
    samtools index $i-sincompartidos-vs-RB-map_bam $i-
sincompartidos-vs-RB-map_bai
    samtools depth -d1000000 $i-sincompartidos-vs-RB-map_bam > $i-
sincompartidos-vs-RB-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-sincompartidos-vs-RB.bam > $i-
sincompartidos-vs-RB-coverage
    samtools index $i-sincompartidos-vs-RB-sorted.bam $i-
sincompartidos-vs-RB-sorted.bam.bai
    bowtie2 -p 4 -x DSST_13_VT_ref -U $i-sincompartidos.fastq -S
$i-sincompartidos-mapped-VT.sam
    samtools view -S -F4 $i-sincompartidos-mapped-VT.sam > $i-
sincompartidos-vs-VT.sam
    samtools view -bST DSST_13_VT_refseq.fasta $i-sincompartidos-
vs-VT.sam > $i-sincompartidos-vs-VT.bam
    samtools sort -o $i-sincompartidos-vs-VT-sorted.bam $i-
sincompartidos-vs-VT.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-sincompartidos-vs-VT-sorted.bam >
$i-sincompartidos-vs-VT-map_bam
    samtools index $i-sincompartidos-vs-VT-map_bam $i-
sincompartidos-vs-VT-map_bai
    samtools depth -d1000000 $i-sincompartidos-vs-VT-map_bam > $i-
sincompartidos-vs-VT-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-sincompartidos-vs-VT.bam > $i-
sincompartidos-vs-VT-coverage
    samtools index $i-sincompartidos-vs-VT-sorted.bam $i-
sincompartidos-vs-VT-sorted.bam.bai
done
##### ANALISIS CON DATASETS CON READS COMPARTIDOS #####
for i in $(ls | grep 13-compartidos.fastq | rev | cut -c19- | rev |
uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bowtie2 -p 4 -x MH186146_ref -U $i-compartidos.fastq -S $i-
compartidos-mapped-RB.sam
    samtools view -S -F4 $i-compartidos-mapped-RB.sam > $i-
compartidos-vs-RB.sam
    samtools view -bST MH186146.fasta $i-compartidos-vs-RB.sam >
$i-compartidos-vs-RB.bam

```

```

    samtools sort -o $i-compartidos-vs-RB-sorted.bam $i-
compartidos-vs-RB.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-compartidos-vs-RB-sorted.bam > $i-
compartidos-vs-RB-map_bam
    samtools index $i-compartidos-vs-RB-map_bam $i-compartidos-vs-
RB-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-compartidos-vs-RB-map_bam > $i-
compartidos-vs-RB-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-compartidos-vs-RB.bam > $i-
compartidos-vs-RB-coverage
    samtools index $i-compartidos-vs-RB-sorted.bam $i-compartidos-
vs-RB-sorted.bam.bai
    bowtie2 -p 4 -x DSST_13_VT_ref -U $i-compartidos.fastq -S $i-
compartidos-mapped-VT.sam
    samtools view -S -F4 $i-compartidos-mapped-VT.sam > $i-
compartidos-vs-VT.sam
    samtools view -bST DSST_13_VT_refseq.fasta $i-compartidos-vs-
VT.sam > $i-compartidos-vs-VT.bam
    samtools sort -o $i-compartidos-vs-VT-sorted.bam $i-
compartidos-vs-VT.bam
    samtools view -h -F4 -b $i-compartidos-vs-VT-sorted.bam > $i-
compartidos-vs-VT-map_bam
    samtools index $i-compartidos-vs-VT-map_bam $i-compartidos-vs-
VT-map.bai
    samtools depth -d1000000 $i-compartidos-vs-VT-map_bam > $i-
compartidos-vs-VT-map_depth.txt
    samtools stats -c 1,1000,1 $i-compartidos-vs-VT.bam > $i-
compartidos-vs-VT-coverage
    samtools index $i-compartidos-vs-VT-sorted.bam $i-compartidos-
vs-VT-sorted.bam.bai
done
##### DETECCIÓN DE SNPs #####
#
#      ----LoFreq----
## -i "AF>0.01". Flag to filter by (i.e. only keeps calls with allele
frequency > 1%).
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f MH186146.fasta -o DSST_25-vcf
DSST_25-RB-sorted.bam
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f MH186146.fasta -o DSST_17-vcf
DSST_17-RB-sorted.bam
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f MH186146.fasta -o 13wo-RB-vcf
13-sincompartidos-vs-RB-sorted.bam
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f MH186146.fasta -o 13comRB-vcf
13-compartidos-vs-RB-sorted.bam
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f DSST_13_VT_refseq.fasta -o
13wo-VT-vcf 13-sincompartidos-vs-VT-sorted.bam
lofreq call-parallel --pp-threads 4 -f DSST_13_VT_refseq.fasta -o
13comVT-vcf 13-compartidos-vs-VT-sorted.bam
for i in $(ls | grep vcf | rev | cut -c5- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    bgzip $i-vcf
    tabix $i-vcf.gz
    bcftools stats $i-vcf.gz > $i-vcf-stats.vchk
    bcftools filter -i "AF>0.01" $i-vcf.gz -o $i-filtered-freq.vcf
done
##### ANOTACIÓN DE SNPs #####
#
#      -----snpEff-----

java          -jar          snpEff.jar          MH186146.1
~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/DSST_17-filtered-freq.vcf > DSST_17-
ann.vcf

```

```

java -jar snpEff.jar MH186146.1 ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/DSST_25-filtered-freq.vcf > DSST_25-ann.vcf
java -jar snpEff.jar MH186146.1 ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/13comRB-filtered-freq.vcf > 13comRB-ann.vcf
java -jar snpEff.jar MH186146.1 ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/13wo-RB-filtered-freq.vcf > 13wo-RB-ann.vcf
java -jar snpEff.jar DSST_13_VT_refseq ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/13comVT-filtered-freq.vcf > 13comVT-ann.vcf
java -jar snpEff.jar DSST_13_VT_refseq ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/13wo-VT-filtered-freq.vcf > 13wo-VT-ann.vcf
mv *-ann.vcf ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis
#####
#-----Reconstrucción de Haplotipos-----
#####
# -----CliqueSNV-----
for i in $(ls | grep map_bam | rev | cut -c9- | rev | uniq)
do
    echo "el nombre del archivo es : $i"
    java -Xmx6G -jar ~/bin/cliq-uv-snv.jar -m snv-illumina -in $i-map_bam -outDir ~/Escritorio/Majo/QS_Analysis/CliqueSNV/$i-snv -t 10 -tf 0.01 -log
done

```