



# IV Simposio Nacional I Congreso Latinoamericano

Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus  
3-5 de noviembre de 2014. Salto, Uruguay



## CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BIOLÓGICA DE AISLAMIENTOS DE CAMPO DE CTV DE URUGUAY Y SU POTENCIAL EN LA PROTECCIÓN CRUZADA.

Rubio, Leticia <sup>(1)</sup>; Bertalmío, Ana <sup>(1)</sup>; Rivas, Fernando <sup>(1)</sup>; Colina, Rodney <sup>(2)</sup>; Benitez, María José <sup>(2)</sup>; Maeso, Diego <sup>(1)</sup>

(1) Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay. [dmaeso@inia.org.uy](mailto:dmaeso@inia.org.uy).

(2) Laboratorio de Virología, Universidad de la República, Regional Norte, Salto.

**Palabras clave:** CTV, aislamiento, protección cruzada.

### Introducción

*Citrus tristeza virus* (CTV) es el agente causal de la tristeza, una de las enfermedades virales más importantes de los cítricos. A partir de 1930 provocó la muerte de millones de plantas en plena producción injertadas sobre naranjo agrio (Bar-Joseph *et al.*, 1989). En nuestro país, CTV es endémico debido en parte a la presencia de su vector más eficiente, *Toxoptera citricida* (Bentancour *et al.*, 1999). Actualmente el 90% de la citricultura del país utiliza *P. trifoliata* o sus híbridos como portainjerto, resistentes a la enfermedad, lo cual impide el desarrollo del síntoma típico de la Tristeza (declinamiento y muerte de árboles). Sin embargo, se han reportado pérdidas de productividad en pomelos y ciertas variedades de naranjo dulce, aún al estar injertados sobre portainjertos resistentes (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Moreno, 2000); debido a la producción de acanaladuras en la madera que afectan el vigor de las plantas y el calibre de las frutas. Si bien es posible eliminar este patógeno durante la etapa de saneamiento, la abundancia de plantas infectadas y del vector en el campo, aumentan el riesgo potencial que las plantas saneadas sean re-infectadas en poco tiempo. Las plantas de cultivos comerciales, se encuentran infectadas con una mezcla de aislados de diferentes propiedades biológicas y agresividad (Garnsey *et al.*, 2005), existiendo en ciertas circunstancias, aislados débiles que protegen del efecto nocivo de los aislamientos severos. La solución al manejo de la enfermedad en países con una situación similar a la de Uruguay (portainjertos tolerantes y abundancia de *T. citricida*) ha sido inocular las plantas “saneadas” previo a su liberación con aislamientos débiles locales con buena capacidad de protección. Esta medida es conocida como “protección cruzada” o “pre-inmunización” (Roistacher *et al.*, 2010) y es usada con éxito en Japón, Brasil y Sudáfrica (Costa y Müller, 1980). El mecanismo de protección cruzada sería una alternativa interesante de manejo en nuestra situación pero para implementarlo es necesario conocer las características de los aislados locales e identificar aquellos que se adecuen a esa estrategia. El objetivo de este trabajo ha sido determinar la severidad de aislamientos de campo de CTV mediante bio-ensayos en plantas de referencia y caracterizarlos mediante métodos moleculares.



# IV Simposio Nacional I Congreso Latinoamericano

Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus  
3-5 de noviembre de 2014. Salto, Uruguay



## **Materiales y métodos**

Se seleccionaron veinte aislamientos procedentes de distintas variedades colectadas en prospecciones de montes cítricos comerciales del Norte y Sur del país. La presencia de CTV en las muestras fue confirmada mediante la prueba serológica DAS ELISA (Bar Joseph *et al.*, 1979) utilizando reactivos provenientes de Plant Print Diagnostics (Valencia, España).

**a) Bioensayos.** Se realizaron según la metodología propuesta por Garnsey *et al.*, 1987, en un invernadero a prueba de insectos y con temperatura controlada (18-26°C). Cada aislamiento fue inoculado mediante el injerto de dos trozos de corteza, en tres plantines de cinco indicadoras diferentes: *C. aurantifolia* (Lima mexicana, LM), *C. sinensis* (Naranja Dulce, ND), *C. aurantium* (Naranja Agrio, NA), *C. paradisi* (Pomelo Duncan, PD) y ND injertado sobre NA (ND/NA). El diseño se completó con cuatro controles negativos para cada grupo de indicadoras y cuatro controles positivos, dos de ellos provenientes de un aislamiento suave y los otros dos de un aislamiento severo. Durante períodos variables, según la indicadora, se evaluaron las brotaciones post-inoculación registrando los síntomas esperables para cada una. En LM se evaluó: aclaramiento de nervaduras, hoja de “cuchara”, nervadura corchosa, acanaladuras de la madera y enanismo; en ND y PD: clorosis, enanismo y acanaladuras en la madera; en NA: amarillamiento del plantín y enanismo; en ND/NA: enanismo, clorosis en hojas y a lo largo de la nervadura principal. Las acanaladuras en la madera se evaluaron una vez finalizado el test en la madera descortezada. Se valoró la severidad de los síntomas usando una escala de 0 a 3, de modo de obtener una respuesta caracterizada en cuanto a tipo y severidad de los síntomas inducidos por los diferentes aislados. Se elaboró un índice de severidad para cada aislamiento, considerando la totalidad de síntomas producidos en cada indicadora al final del bioensayo, y finalmente un índice acumulativo considerando el conjunto de indicadoras.

**b) Caracterización molecular.** Se utilizó la técnica de amplificación por RT-PCR, utilizando el método “primer específico” para los genes P25, P20 y P23 (genes supresores del silenciamiento por ARN interferencia y que brindan información filogenética) de CTV según la metodología de propuesta por Iglesias *et al.*, 2008. Los productos amplificados fueron secuenciados y las secuencias nucleotídicas fueron alineadas con cepas de referencia internacional, construyéndose los árboles filogenéticos por el método de Neighbor joining del programa Mega 5.

## **Resultados y discusión.**

En los bioensayos todos los aislamientos produjeron los síntomas esperables en al menos una indicadora, con variabilidad en el grado de expresión de los mismos. En LM se observó aclaramiento de nervaduras, hojas “cuchara” y nervadura corchosa a los dos meses pos-inoculación. En el resto de las indicadoras los síntomas se manifestaron a los cuatro y seis meses luego de la inoculación. En NA y PD se observó amarillamiento del plantín y enanismo, en ND/NA se observó clorosis en la nervadura central de la hoja (síntoma asociado al declinamiento) y en ND y PD, al año de la inoculación se observaron distintos grados de acanaladuras en la madera. Según las respuestas observadas durante la caracterización biológica, es posible diferenciar



# IV Simposio Nacional I Congreso Latinoamericano

Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus  
3-5 de noviembre de 2014. Salto, Uruguay



grupos de aislados que comparten ciertas reacciones. Un grupo produjo síntomas leves en LM y podría considerarse como poco virulento, otro manifestó síntomas leves a moderados en LM y leves en alguna otra indicadora, un tercer grupo (25% de los aislados) generó síntomas moderados en LM, PD y/o NA y leves en ND/NA y otro grupo (45% de los aislamientos) presentó síntomas moderados y altos en todas las indicadoras, se trata de aislamientos que provocan síndrome de amarillamiento del plantín, declinamiento, enanismo y acanaladuras en la madera, además de nervadura corchosa en ciertos casos; éstos serían considerados aislados de CTV muy severos. Un resumen de los resultados se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de la severidad de los principales síntomas producidos por los distintos aislamientos en cada indicadora (\*).

<b>Aislamiento</b>	<b>LM</b>	<b>ND/NA</b>	<b>NA</b>	<b>PD</b>	<b>ND</b>	<b>Total</b>
<b>C1</b>	1.0	0	2	0	0	3.0
<b>C3</b>	1.8	2.7	0	0	0	4.5
<b>SG4</b>	4.0	0	0	0	5	9.0
<b>C2</b>	1.9	1.3	3	4	0	10.2
<b>A12</b>	9.6	0.7	0	1.2	1.5	13.0
<b>M1</b>	10.1	5.3	0	6.4	3	24.8
<b>CG1</b>	13.3	5.3	0	6.4	1.5	26.5
<b>A3</b>	12.5	2	6	4	5	29.5
<b>A8</b>	12.6	1.3	3	8	5	29.9
<b>A6</b>	13.8	2	4	4	8	31.8
<b>M15</b>	14.7	2.7	0	12	3	32.4
<b>A11</b>	12.8	8	6	4	3	33.8
<b>A1</b>	8.3	2	2	8	15	35.3
<b>SA2</b>	9.5	12.7	5	4	8	39.2
<b>A10</b>	13.0	9.4	6	8	6.5	42.9
<b>SA1</b>	11.0	6.7	8	9.2	8	42.9
<b>S1</b>	17.5	9.3	4	8	8	46.8
<b>SG6</b>	12.8	12	8	8	10	50.8
<b>AZ1</b>	18.5	14	8	10.4	8	58.9
<b>MI</b>	20.0	6.7	9	8	13	56.7

(\*) Cada valor obtenido según una escala 0-3 donde 0= sin síntomas, 1= leves, 2 moderados y 3= severos) fue ponderado por la importancia del síntoma generado considerando el impacto que tendría cada especie o combinación a nivel de campo: LMx1, ND/NAx2, NAx3, PDx4, NDx5.

En cuanto a la caracterización molecular, para los tres genes en estudio la mayoría de los aislamientos locales se agrupan con aislamientos severos de referencia internacional (ej. VT de Israel) y muchos presentan mayor similitud con aislados severos de la región (Argentina) (Fig. 1).

Estos resultados indicarían que en nuestro país, tanto en el Norte como en el Sur, circulan con mayor grado aislamientos severos de CTV, los que podrían estar incidiendo en la productividad de las plantas, lo que refuerza la necesidad de buscar aislados promisorios para implementar un programa de protección cruzada. El próximo



paso de esta línea de trabajo será la separación de haplotipos en los aislados de campo mediante la transmisión por pulgones en condiciones controladas.

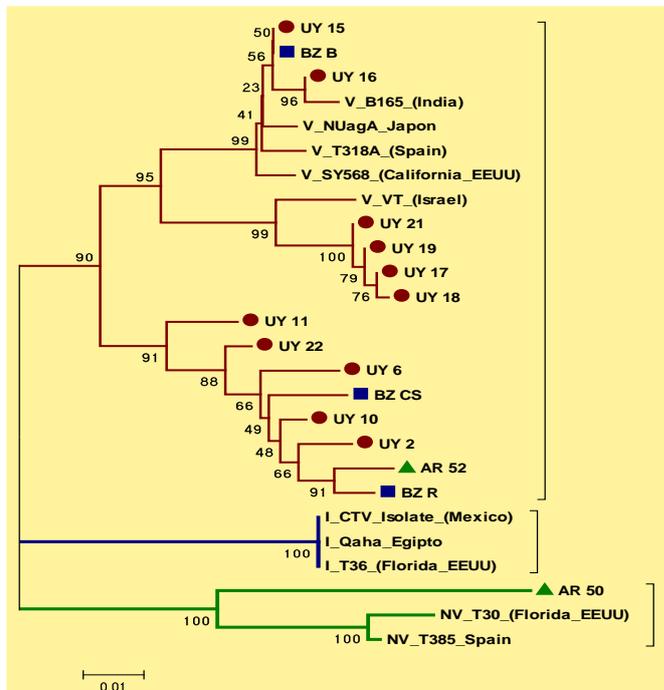


Fig.1. Árbol filogenético para el gen P23 (\*).  
(\* UY corresponde a los aislamientos locales en estudio)

## Referencias bibliográficas

- Bar-Joseph, M.; Marcus, M.; Lee, R.** 1989. The continuous challenge of *Citrus Tristeza Virus* control. Annual Review of Phytopathology, 27: 291-316.
- Bar-Joseph, M.; Garnsey, S.; Gonsalves, D.; Moscovitz, M., Purcifull, D.; Clark, M.; Loebenstein, G.** 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. Phytopathology 69: 190-194.
- Bentancourt, C.; Scatoni, I.** 1999. Guía de insectos y ácaros de importancia agrícola y forestal en el Uruguay. Montevideo, Facultad de Agronomía - PREDEG/GTZ.
- Cambra, M., Moreno, P.** 2000. Tristeza. In: Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. N°2: 77-81.
- Costa, A.; Müller, G.** 1980. *Tristeza* controlled by cross protection. A U.S.- Brazil cooperative success. Plant Disease. 64: 538-541.
- Garnsey, S.; Civerolo, I.; Gumpf, J.; Paul, C., Hilf, E.; Lee, R.; Brlansky, R.; Yokomi, K.; Hartung, S.** 2005. Biological characterization of an International Collection of Citrus tristeza virus (CTV) isolates. In: M. E. Hilf, N. Duran-Vila, M.A. Rocha-Peña (eds.). Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 75-93.
- Garnsey, S.; Gumpf, J.; Roistacher, C.; Civerolo, I.; Lee, R.; Yokomi, K.; Bar-Joseph, M.** 1987. Toward standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. Phytophylactica 19: 151-157.
- Iglesias, N.; Gago-Zachert, S.; Robledo, G.; Costa, N.; Plata, M.; Vera, O.; Grau O & Semorile, L.** 2008. Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. *Virus Genes* 36: 199-207.
- Roistacher, C.; Da Graça, J.; Müller, G.** 2010. Cross Protection Against *Citrus tristeza virus* - a Review. In: *Proc. 17th Conf. IOCV*, 1-27.