

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS



**INCIDENCIA, CARACTERIZACIÓN Y
EPIDEMIOLOGÍA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA
DE LOS CÍTRICOS EN CHILE**

TESIS DOCTORAL

Ximena Besoain Canales

Valencia, 2008

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS



INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES AGRARIAS

CENTRO DE PROTECCIÓN VEGETAL Y BIOTECNOLOGÍA



Tesis Doctoral

**INCIDENCIA, CARACTERIZACIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA DEL
VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN CHILE**

**Memoria presentada por:
Ximena BESOAIN CANALES
Para optar al grado de DOCTOR**

**Director:
Dr. Mariano CAMBRA ÁLVAREZ**

Valencia, 2008



GENERALITAT VALENCIANA
Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación

**INSTITUTO VALENCIANO DE INVESTIGACIONES
AGRARIAS**

Carretera Moncada a Náquera Km. 4,5, 46113-MONCADA,
VALENCIA, SPAIN

Dn. Mariano Cambra Álvarez, Doctor Ingeniero Agrónomo, Profesor de Investigación del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA),

CERTIFICA:

Que Dña. Ximena Besoain Canales ha realizado bajo su dirección en el laboratorio de Virología e Inmunología del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Moncada (Valencia), España y en la Facultad de Agronomía de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile, el trabajo que con el título de "Incidencia, caracterización y epidemiología del virus de la tristeza de los cítricos en Chile", presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad Politécnica de Valencia.

Para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 16 de enero de 2008.

A mis padres

Raúl y Gloria

A mis hijos

Carlitos y Rosario

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a la Universidad Politécnica de Valencia, por la oportunidad de realizar mis cursos de doctorado en esta casa de estudios. En forma especial deseo destacar la valiosa colaboración de mi Profesor tutor, Dr. Manuel Agustí Fonfría, ya que sin su sabio y oportuno consejo difícilmente hubiese realizado esta travesía. También deseo agradecer por su generosa entrega a los diferentes catedráticos de las asignaturas que cursé, en forma especial a Concha Jordá Gutiérrez y José García Jiménez.

Al Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, y en forma especial a su Director Dr. Florentino Juste Pérez, así como al Director del Centro de Protección Vegetal y Biotecnología, Dr. Luis Navarro, por la oportunidad de realizar mi tesis de doctorado, y en cuyas dependencias y laboratorios he vivido, aunque a intervalos, sintiéndome como en mi verdadera casa. A Mariano Cambra Álvarez, profesor e investigador de este centro, por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio que dirige, y por su incondicional guía, estímulo y siempre buena disposición.

Al Ministerio de Educación del Estado de Chile, por el financiamiento parcial de estos estudios de doctorado, otorgados a través de un proyecto MECESUP. Al Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura de Chile, por toda la colaboración brindada a lo largo de la prospección y estudio, por numerosos profesionales y técnicos de esta institución. Agradecer a su vez, a este ministerio, por el financiamiento parcial de este trabajo a través de un proyecto Fondo-SAG.

Al Rector de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Profesor Alfonso Muga Naredo, por el patrocinio recibido, sin el cual no hubiese podido realizar estos estudios. Al Decano de la Facultad de Agronomía de esta universidad, Profesor Pedro Undurraga Martínez, por la siempre buena disposición y apoyo para realizar mis estudios, y facilitar parte de los recursos para realizar los constantes viajes y estadías para llevar a cabo este doctorado. A los profesores de esta facultad, quienes me brindaron su apoyo incondicional, en forma especial deseo destacar a los Drs. Eduardo Salgado y Marco Cisternas, por sus permanentes estímulos y oportunos consejos.

A los diferentes investigadores que laboran en el IVIA, quienes desinteresadamente apoyaron mi trabajo, estimulándome a perseverar en este arduo camino, en forma especial deseo destacar a la Dra. Nuria Durán-Vila, por su amistad y sabios consejos, al Dr. Pedro Moreno por su generosidad y aportes a mi estudio, al Dr. José Guerri por su apoyo y palabras de ánimo, a la Dra. María José Asins por su siempre pronta ayuda, al Dr. Leandro Peña por su amistad y afecto, al Dr. Alfonso Hermoso de Mendoza, por su siempre buena disposición y cooperación en la identificación de pulgones, y traducirme el resumen al valenciano.

Al personal del Instituto de Investigaciones Agrarias de Valencia, de quienes siempre obtuve muestras de afecto y de generosa entrega. Un especial recuerdo a Pepe Lliso, guardia de seguridad siempre atento y eficaz, y a Ana Martínez, cuidadora de la Masía, en donde pasé muchos meses de mi vida, sintiéndome como en mi hogar.

A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Virología e Inmunología, IVIA, quienes siempre tuvieron una desinteresada y oportuna ayuda, incluso considerando que mi estadía ocurría a intervalos. Deseo destacar la colaboración de los doctores: Nieves

Capote, Antonio Olmos y en forma especial a Edson Bertolini, de quién estaré siempre agradecida por su amabilidad e incondicional ayuda. A María Teresa Gorris y Mari Carmen Martínez por el apoyo brindado, a Ana Rodríguez por su calidez, a Consuelo Collado por su apoyo en identificar los non-natos y por su constante buen humor, y a mi compañera de doctorado Maite Gil por toda la cooperación brindada.

A todos los productores y empresarios citricultores chilenos, los que superan los 2000, de quienes siempre he tenido una generosa colaboración, sobre todo facilitándome la posibilidad de efectuar prospecciones, ensayos y evaluaciones. En forma especial, a los citricultores de los oasis de Pica y Matilla en donde he realizado parte de esta tesis, y a los agricultores de la IV, V y Región Metropolitana, a quienes he decidido, por razones de impacto de este virus dejar en anonimato.

También deseo agradecer a las personas que colaboraron y contribuyeron desde Chile a que pudiese terminar este trabajo; en forma especial deseo destacar a Fiona Ramella y Erika Briceño, quienes permitieron que el Laboratorio continuase trabajando sin problemas mientras realizaba mis diversas estadías, a Teresa Álvarez por su valiosa colaboración en análisis de laboratorio, A Gladys Andrade por su alto espíritu y permanente apoyo, a Iván Cortés, por su sencillez y espíritu de colaboración. A mis alumnos de taller, Rodrigo Torres, Germán Ossandón y Margarita Torres, quienes trabajaron en la colección de datos de terreno. A Cristián Canales, Mauricio Cisternas y Ramiro Vera, cuyo trabajo de prospección en terreno fue la base para elaborar esta tesis.

A mi compatriota Verónica Raga, por toda la ayuda y amistad brindada, a quién le deseo el mayor de los éxitos y un feliz retorno a Chile. A Zule Vallejo por su permanente estímulo y compañía en Chile durante todo el desarrollo de este escrito y a Cristina Rojas por la cooperación brindada en coleccionar los artículos científicos. A Juanita y Olivia, ya que sin su ayuda difícilmente hubiese podido alejarme del nido. A Carlos y familia por el apoyo y palabras de ánimo.

También expresar mi gratitud hacia mi familia, en forma especial a mis padres, quienes desde pequeña me orientaron y alentaron a crecer. A mis amigos y sobre todo amigas, de quienes siempre recibí estímulos y buenos deseos, sobre todo en los momentos difíciles que a uno siempre le toca vivir.

Deseo expresar mi más sincero y profundo sentimiento de gratitud a Mariano y Chiqui, quienes contribuyeron con total entrega y generosidad a mi crecimiento como profesional e investigadora. Me siento afortunada de la amistad que me han brindado a lo largo de estos años, y de los gratísimos y bellos momentos que compartimos, en especial junto a sus encantadoras hijas y madre, Alicia, María y Carito.

Finalmente, a mis hijos Carlos Ignacio y María Rosario, quienes nunca dejaron de apoyarme, considerando incluso que durante una parte de sus vidas me he comunicado a la distancia, pero a los que nunca he dejado de amar ni de sentirme por ellos muy amada.

*“Todas íbamos a ser reinas
de cuatro reinos sobre el mar:*

*Lo decíamos embriagadas,
y lo tuvimos por verdad,
que seríamos todas reinas
y llegaríamos al mar.”*

Gabriela Mistral

ÍNDICE

RESUMEN, ABSTRACT, RESUMO	I - II
LISTADO DE FIGURAS	III - IV
LISTADO DE CUADROS	V - VI

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS: ANTECEDENTES HISTÓRICOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA.	3
1.2 SÍNDROMES DE TRISTEZA	5
1.2.1 Decaimiento rápido o lento	6
1.2.2 Acanaladuras en la madera	7
1.2.3 Amarillez de plántulas francas de pie	8
1.3 AGENTE CAUSAL: EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS-CTV.	8
1.3.1 Antecedentes taxonómicos	8
1.3.2 Características genómicas y diversidad de aislados	8
1.4 PRINCIPALES HOSPEDADORES	11
1.5 DIAGNÓSTICO: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CTV.	12
1.5.1 Detección de CTV. Técnicas biológicas, serológicas y moleculares	12
1.5.2 Caracterización de aislados de CTV	15
1.6 EPIDEMIOLOGÍA	19
1.6.1 Transmisión por injerto	19
1.6.2 Transmisión mecánica experimental	20

1.6.3 Transmisión por pulgones	20
1.7 ESTRATEGIAS DE CONTROL	25
1.7.1 Control de cuarentena y exclusión	25
1.7.2 Programas de Saneamiento, Certificación y Mejora sanitaria	27
1.7.3 Protección cruzada	28
1.7.4 Resistencia genética	29
2. OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GENERAL	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
3. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 ESTIMA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN CHILE	37
3.1.1 Introducción	37
3.1.2 Materiales y métodos	40
3.1.3 Resultados y discusión	42
3.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS CHILENOS DE CTV	50
3.2.1 Introducción	50
3.2.2 Materiales y métodos	51
3.2.3 Resultados y discusión	53
3.3 CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE AISLADOS CHILENOS	60
3.3.1 Introducción	60
3.3.2 Materiales y métodos	63
3.3.3 Resultados y discusión	64

3.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CHILENOS	69
3.4.1 Introducción	69
3.4.2 Materiales y métodos	72
3.4.3 Resultados y discusión	74
3.5 EPIDEMIOLOGÍA. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DE CTV EN CHILE.	77
3.5.1 Introducción	77
3.5.2 Materiales y métodos	79
3.5.3 Resultados y discusión	84
4. DISCUSIÓN GENERAL	95
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	105
5.1 CONCLUSIONES	107
5.2 RECOMENDACIONES	108
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA

- 1.1. Representación esquemática del genoma del virus de la tristeza de los cítricos. Números correlativos indican los 12 marcos de lectura abierta. Las cajas representan los genes y las anotaciones inferiores a los números indican las proteínas que codifican (Fagoaga *et al.*, 2005). 9
- 3.1. Regiones citrícolas de Chile. En el esquema se indican las siete regiones muestreadas, y las principales especies de cítricos presentes en cada región. 39
- A. Síntomas de acordonamiento de árbol de pomelo cv. Marsh injertado sobre *C. macrophylla*, en donde se observa deformación de tronco y ramas principales. B. Árbol de pomelo cv. Star Ruby injertado sobre *C. macrophylla*, en donde se aprecian acanaladuras en la madera y sobrecrecimiento de la corteza. C. Acanaladuras presentes en portainjerto *C. macrophylla*. Fotos A, B y C fueron tomadas en oasis de Pica. D. Planta indicadora de pomelo cv. Duncan inoculada con aislado capaz de inducir síntomas de acanaladuras en la madera. E. Acanaladura presente en portainjerto *C. macrophylla* injertado con limonero, localidad de Ovalle. 46
- 3.3. Síntomas desarrollados en pruebas biológicas. A. Síntoma de acanaladura de la madera en planta de naranjo dulce cv. Madame Vinous inoculada con aislado 508. Acorchamiento de vena desarrollada en planta de naranjo amargo. C. Izaq. síntoma de amarillez de plántulas ("seedling yellows") desarrollado en naranjo amargo de semilla. D. Síntoma de acorchamiento de venas en lima mejicana. E. Acanaladuras en la madera desarrolladas en lima mejicana. 58
- 3.4. A. Vista parcial del oasis de Pica (I Región), en donde se aprecia la aridez del desierto que lo rodea. B. Brote de cítrico altamente atacado por mosquita blanca. C. Planta de naranjo dulce en proceso de transmisión de CTV por pulgones desde brote de algodón. A la derecha planta receptora. D. Brote de naranjo dulce, con presencia de pulgones luego de 24 horas de alimentación (adquisición). E. Planta donante de lima mejicana injertada sobre citrange Troyer con síntomas de acucharamiento de hojas, y a su lado derecho plantas receptoras. 89
- 3.5. Parcelas 1, 2 y 3 ubicadas en huertos mixtos de cítricos y localizadas los oasis de Pica y Matilla, I Región de Chile, en donde se observa la evolución espacio-temporal de los árboles infectados con CTV. 91
- 3.6. Parcelas ubicadas en 3 huertos de cítricos localizados en la zona central de Chile, en donde se observa la evolución espacio-temporal de los árboles infectados con CTV. 92

3.7. Evolución temporal (2000-2005) del porcentaje de incidencia de CTV, en seis parcelas experimentales localizadas en la I Región (Predio 1 y 2 de Pica) y en la zona central (Ovalle, Limache y Paine) de Chile.

LISTADO DE CUADROS

CUADRO

3.1. Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) por especies hospederas en Chile.	47
3.2. Distribución de aislados de CTV por regiones y especie hospedera.	47
3.3 Detección de CTV en diferentes regiones de Chile entre los años 1999-2002. Detalle del número de fincas prospectadas, superficie, número de árboles muestreados por región e incidencia.	48
3.4. Incidencia estimada del virus de la tristeza de los cítricos (%) en 20 fincas diferentes localizadas en seis regiones de Chile, en contraste con la incidencia real calculada 1-4 años después.	49
3.5. Origen y expresión de síntomas de cien aislados chilenos del virus de la tristeza (CTV), después de ser inoculados mediante injerto a 5 diferentes combinaciones de plantas indicadoras según Garnsey <i>et al.</i> (1987) más caracterización de su capacidad de provocar decaimiento según Pina <i>et al.</i> (2004).	56
3.6. Grupos biológicos obtenidos mediante la caracterización biológica de cien aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).	59
3.7. Serogrupos (8 en total) establecidos con 100 aislados chilenos de CTV, obtenidos mediante análisis ELISA-DASI empleando 12 anticuerpos monoclonales diferentes.	66
3.8. Caracterización biológica y serológica de 100 aislados de CTV chilenos, en donde se representan con colores los 8 serogrupos obtenidos.	67
3.9. Clasificación y caracterización molecular de aislados mediante el empleo de 11 pares de iniciadores de PCR según Hilf <i>et al.</i> (2005).	76
3.10. Número de individuos de pulgones/especie capturados mediante el método de brote pegajoso, durante otoño y primavera de 2003 al 2005, y número de pulgones CTV positivos/especie, detectados mediante variantes de RT-PCR.	88
3.11. Aislados chilenos de CTV empleados en ensayos de transmisión mediante el uso de <i>Aphis gossypii</i> como vector.	90
3.12. Clasificación general de 100 aislados chilenos de CTV, considerando lugar de origen, especie hospedante, caracterización biológica, serológica y molecular, esta última por RT-PCR utilizando 11 pares de iniciadores diferentes.	100

3.13. Agrupación de 100 aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) de acuerdo a sus características biológicas, serológicas y moleculares. Cuadro resumen.	102
3.14. Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización biológica de cien aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).	103

RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) ha causado millonarias pérdidas a la citricultura a nivel mundial. En el caso de Chile, hasta el inicio del presente estudio la situación real era desconocida aunque se había reportado la presencia del virus a fines de la década de 1960 en limoneros Meyer que fueron erradicados. Considerando la importancia de CTV y la enfermedad que causa, el objetivo básico de esta tesis fue analizar la situación actual de CTV en Chile, realizar una amplia prospección, estimar su incidencia, estudiar su epidemiología y realizar una completa caracterización biológica, serológica y molecular de aislados chilenos de CTV representativos. La incidencia fue estimada con un muestreo del 1% de los árboles en las regiones citrícolas: I, III, IV, V, VI, VII y Metropolitana. CTV fue detectado mediante ELISA-DAS de 1999 a 2001 y mediante Inmunoimpresión-ELISA de 2001 a 2004, ambas técnicas con la combinación de anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5. Además, se anotaron síntomas y se muestrearon e identificaron colonias de pulgones presentes en los huertos. Se colectaron 100 aislados de CTV de diferentes hospedadores y zonas ecológicas, que fueron caracterizados. La caracterización biológica se llevó a cabo en lima mejicana, naranjos dulce y agrio, pomelo, y las combinaciones dulce/agrio y agrio/dulce. La caracterización serológica fue realizada mediante ELISA-DASI con 12 anticuerpos monoclonales diferentes. La caracterización molecular se efectuó mediante RT-PCR con 12 pares de iniciadores distintos. Adicionalmente, se realizó RT-PCR y PCR a tiempo real con iniciadores universales de CTV. Además, se realizó un estudio epidemiológico para evaluar la evolución espacio-temporal de CTV en seis parcelas experimentales y la realización de dos ensayos de transmisión con 10 aislados chilenos de CTV representativos.

CTV se ha detectado en todas las zonas citrícolas de Chile, a excepción de la VII Región, con una incidencia media del 0,38%, y asociado a todas las especies de cítricos cultivadas. No se observaron síntomas de decaimiento sobre naranjo amargo. En el oasis de Pica (I Región), se observaron acanaladuras en la madera en árboles de pomelo y lima mejicana. Las especies de pulgones vectoras de CTV detectadas fueron: *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* y *Toxoptera aurantii*. De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización de aislados chilenos de CTV, se determina en la zona central de Chile la presencia mayoritaria de aislados atenuados (MCA13 negativos), mientras que en la I Región, se establece la presencia de aislados agresivos, algunos capaces de causar acanaladuras en pomelo y

naranja dulce, siendo todos MCA13 positivos y con características moleculares asociadas al tipo VT. En el estudio espacio-temporal, fue posible demostrar un aumento en la incidencia de CTV en las parcelas experimentales a través del tiempo, salvo en un huerto de limonero. En ensayos de transmisión sólo un aislado fue transmitido con una eficiencia baja de transmisión.

En función de los resultados obtenidos se dan una serie de recomendaciones para la citricultura chilena que incluyen el uso exclusivo de material vegetal certificado y la conveniencia de erradicar los focos con aislados agresivos.

ABSTRACT

Citrus tristeza virus (CTV) has caused substantial economical losses to the citrus industry worldwide. In Chile, the real situation of the disease was not clearly understood until this study was conducted, although the virus had been identified and reported at the end of the 1960 decade, affecting Meyer lemon trees which were eradicated. Considering the importance of CTV and the disease that causes, the basic objective of this thesis was to analyze the present CTV situation in Chile, a broad survey was conducted to estimate its incidence, studying its epidemiology, and carrying out a complete biological, serological and molecular characterization of the CTV Chilean representative isolates. The incidence was estimated sampling 1% of the trees from the citrus tree regions: I, III, IV, V, VI, VII and Metropolitan Region. CTV was detected by ELISA-DAS between the years 1999-2001 and by Tissue Print-ELISA between the years 2001-2004. Both techniques were carried out combining the monoclonal antibodies 3DF1 and 3CA5. Furthermore, symptoms were recorded, established aphid species colonies monitored and identified. One hundred CTV isolates collected from different hosts and ecological zones were characterized. The biological characterization was conducted on Mexican lime, sweet and sour orange, grapefruit and the sweet/sour and sour/sweet combinations. The serological characterization was done by DAS-ELISA with twelve different CTV specific monoclonal antibodies. The molecular characterization was done employing 12 different pairs of RT-PCR primers. Additionally RT-PCR and real-time PCR were carried out with CTV universal primers. Also, an epidemiological study was conducted to evaluate the spatial-temporal evolution of CTV in six different experimental plots, and two transmissions tests were done with ten representative Chilean CTV isolates.

CTV was detected in all the citrus regions in Chile, with the exception of Region VII, with an average media of 0.38% and associated to all the citrus species. Decline symptoms were not found on trees grafted on sour orange. In the Pica Oasis (Region I), stem pitting was found in grapefruit and Mexican lime trees. The CTV vector aphid species detected were: *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* and *Toxoptera aurantii*. According to the results obtained in the CTV Chilean isolate characterization, most isolates present in the central zone of Chile were considered mild (MCA 13 negative), while in the Region I, the presence of severe isolates was established, some capable of causing stem pitting on grapefruit and sweet orange, all resulting MCA13 positive and with molecular characteristics associated to VT type. In the

spatial-temporal study, it was possible to demonstrate an increase in the CTV incidence in the experimental plots over time, with the exception of one lemon plot. In the transmission trials only one CTV isolate was transmitted with low efficiency.

In view of the results obtained, a series of recommendations are given to the Chilean citrus industry which include the exclusive use of certified plant material and the convenience of eradicating the source of severe isolates.

RESUM

El virus de la tristesa dels cítrics (CTV) ha causat milionàries pèrdues a la citricultura a nivell mundial. En el cas de Xile, fins a l'inici del present estudi la situació real era desconeguda encara que s'havia reportat la presència del virus a finals de la dècada de 1960 en llimeres Meyer que van ser eradicades. Considerant la importància de CTV i la malaltia que causa, l'objectiu bàsic d'aquesta tesi va ser analitzar la situació actual de CTV a Xile, realitzar una àmplia prospecció, estimar-ne la incidència, estudiar-ne l'epidemiologia i realitzar una completa caracterització biològica, serològica i molecular d'aïllats xilens de CTV representatius. La incidència va ser estimada amb un mostreig de l'1% dels arbres en les regions cítriques: I, III, IV, V, VI, VII i Metropolitana. CTV va ser detectat mitjançant ELISA-DAS del 1999 al 2001 i mitjançant Immunoimpressió-ELISA del 2001 al 2004, ambdues tècniques amb la combinació d'anticossos monoclonals 3DF1 i 3CA5. A més, es van anotar símptomes i es mostrejaren i identificaren colònies de pugons presents en els horts. Es van col·lectar 100 aïllats de CTV de diferents hospedadors i zones ecològiques, que van ser caracteritzats. La caracterització biològica es va dur a terme en llimera mexicana, tarongers dolç i bord, aranger, i les combinacions dolç/bord i bord/dolç. La caracterització serològica va ser realitzada mitjançant ELISA-DAS amb 12 anticossos monoclonals diferents. La caracterització molecular es va efectuar mitjançant RT-PCR amb 12 parells d'iniciadors diferents. Addicionalment, es va realitzar RT-PCR i PCR a temps real amb iniciadors universals de CTV. A més, es va realitzar un estudi epidemiològic per a avaluar l'evolució espai-temporal de CTV en sis parcel·les experimentals i la realització de dos assajos de transmissió amb 10 aïllats xilens de CTV representatius.

CTV s'ha detectat en totes les zones cítriques de Xile, a excepció de la VII Regió, amb una incidència mitjana del 0,38%, i associat a totes les espècies de cítrics cultivades. No es van observar símptomes de decaïment sobre taronger bord. En l'oasi de Pica (I Regió), es van observar estries en la fusta en arbres d'aranger i llimera mexicana. Les espècies de pugons vectors de CTV detectades van ser: *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* i *Toxoptera aurantii*. D'acord amb els resultats obtinguts en la caracterització d'aïllats xilens de CTV, es determina en la zona central de Xile la presència majoritària d'aïllats atenuats (MCA13 negatius), mentre que en la I Regió s'estableix la presència d'aïllats agressius, alguns capaços de causar estries en aranger i taronger dolç, sent tots MCA13 positius i amb característiques

moleculars associades al tipus VT. En l'estudi espai-temporal, va ser possible demostrar un augment en la incidència de CTV a les parcel·les experimentals a través del temps, excepte en un hort de llimera. En assajos de transmissió només un aïllat va ser transmés amb una eficiència baixa de transmissió.

En funció dels resultats obtinguts es donen una sèrie de recomanacions per a la citricultura xilena que inclouen l'ús exclusiu de material vegetal certificat i la conveniència d'eradicar els focus amb aïllats agressius.

1. Introducción

1.1 LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS: ANTECEDENTES HISTÓRICOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA

La enfermedad de la tristeza ha sido considerada como la virosis más importante y devastadora de la citricultura a escala mundial (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Moreno, 2000). Es muy posible que sea originaria de Asia como lo cítricos, y desde ahí se haya dispersado prácticamente a la totalidad de las zonas cítricas del mundo a través del intercambio de material de propagación. Probablemente en el siglo XVII se extendió a Sudáfrica, luego a Australia, al área de Sydney en la segunda mitad del siglo XIX, y posteriormente en el siglo XX a América (Broadbent *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000). Uno de los aspectos que influyó considerablemente en el desarrollo de esta enfermedad, fue la previa destrucción masiva, por parte de *Phytophthora* sp., de árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) formados de semilla, lo que se tradujo en el uso masivo del portainjerto naranjo amargo o agrio (*Citrus aurantium* L.), debido a su tolerancia a este patógeno (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Sin embargo, cuando este portainjerto se utilizó en Australia (1860) y en Sudáfrica (1891), los árboles murieron, lo que se atribuyó a un problema de incompatibilidad. Posteriormente, algunos autores como Webber en 1925 y Toxopeus en 1937 citados por Bar-Joseph *et al.* (1989), rechazaron esta hipótesis, señalando que en estas localidades el problema se debía a agente (s) causal (es) locales. De hecho, en Australia y en Sudáfrica este portainjerto no logró implantarse en forma masiva, ya que las variedades injertadas sobre él, decaían y morían, mientras que árboles injertados sobre portainjertos como *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. y limonero rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.) se desarrollaban en forma adecuada.

La necesidad de cultivar nuevas variedades de cítricos, motivó la introducción masiva de material a América, llegando el agente causal de este problema y su principal insecto vector: *Toxoptera citricida* (Kirk.) (Wallace *et al.*, 1956). Estos autores informan acerca de registros encontrados en Sudáfrica, que indican que 1400 árboles de naranjo dulce cv. Lue Gim Gong injertados sobre limón rugoso fueron exportados a Argentina en julio de 1930, seguidos al año siguiente por la exportación de otros 1200 árboles más. Este hecho más el conocimiento previo de que la mayoría de los árboles de cítricos se encontraban infectados en Sudáfrica, hace suponer que la enfermedad arribó en árboles asintomáticos a Sudamérica. La primera epidemia de decaimiento en extensas plantaciones de árboles de naranjo dulce injertados sobre patrón amargo, ocurrió en Argentina alrededor de 1930 (Wallace, 1978; Bar-Joseph *et al.*, 1989). La rapidez con que la epidemia ocurrió en este país, puede explicarse por tres factores: a) el alto número de

árboles introducidos, b) la gran abundancia del insecto vector, c) la presencia de millones de árboles de naranjo dulce injertados sobre naranjo amargo (Wallace *et al.*, 1956). En 1937, la enfermedad apareció en Brasil donde recibió el nombre de tristeza (Moreira, 1942), nombre apropiado tanto por el síndrome de marchitamiento que produce, como por la devastación y desolación que causaba (Roistacher, 1995). En 1939 se produjo una importante epidemia en Estados Unidos, específicamente en el estado de California (Wallace, 1978).

Dentro de los nombres de enfermedades asociadas con tristeza se encuentran: podredumbre de las raicillas en Argentina, tristeza en Brasil, "quick decline" y "budunion disease" en California (EEUU), "dieback of limes" en Ghana, "stem pitting" cuando afecta a pomelos (*Citrus paradisi* Macf.) en Sudáfrica, "seedling yellows" cuando afecta a plantas de semilla de árboles como: limonero cv. Eureka, naranjos cv. Sevilla, pomelos cv. Marsh, mandarinos cv. Ellendale y citrones en Australia, y enanismo en plantas de "Hassaku dwarf" y "Natsudaidai dwarf" en Japón (Fraser, 1952; Bar-Joseph *et al.*, 1989; Roistacher, 1995; Cambra y Moreno, 2000). Posteriormente, se descubrió que todas estas enfermedades poseían un mismo agente causal (Wallace, 1978; Cambra y Moreno, 2000) (véase apartado 1.3).

Por otro lado, también fueron importantes las pérdidas de productividad de pomelos y ciertas variedades de naranjo dulce ocasionadas por formas agresivas o severas de tristeza, aún cuando estén injertados sobre patrones tolerantes al síndrome de la tristeza (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Van Vuuren y Da Graça, 2000). Así en países de Asia, América del Sur, Australia y África Central y del Sur, se han descrito manifestaciones muy virulentas de la enfermedad, las cuales además de provocar decaimiento en los árboles injertados sobre naranjo agrio (enfermedad de combinación), son capaces de provocar daños directos en variedades de pomelo y/o naranjo dulce, independientemente del patrón usado (Roistacher, 1988; Garnsey y Lee, 1988; Rocha-Peña *et al.*, 1995; Broadbent *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000).

Las pérdidas económicas que ha causado esta enfermedad son muy elevadas, se estima que más de 100 millones los árboles de naranjo dulce, pomelo y mandarina (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle) injertados sobre naranjo amargo, que han muerto desde 1930 por tristeza en todo el mundo (Román *et al.*, 2004). Entre las epidemias más devastadoras, por el gran número de árboles muertos, están: Argentina (1930), Brasil (1937), California, EEUU (1939), Florida, EEUU (1951), España (1957), Israel (1970) y

Venezuela (1980) (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra *et al.*, 1991a; Cambra y Moreno, 2000). En España, estimaciones efectuadas en base a prospecciones realizadas, se ha establecido que han muerto más de 40 millones de árboles de naranjo dulce o mandarinos injertados sobre naranjo amargo, durante el período comprendido entre los años 1935 y 1999 (Cambra *et al.*, 2000a), estimándose en la actualidad en más de 45 millones (M. Cambra, comunicación personal, 2007). Por otro lado, es importante considerar los importantes costos que ha producido en forma indirecta, sobre todo teniendo en cuenta los esfuerzos de exclusión que deben realizar los países y también el control de material de vivero infectado para evitar su dispersión, además de las estrategias de erradicación, el coste de prospecciones y el desarrollo de programas de certificación de plantas (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Gorrís, 2003). Además, a todas estas pérdidas y daños, habría que añadir la imposibilidad de emplear el portainjerto naranjo amargo, hecho que perjudica para enfrentar problemas debidos a gomosis, "blight" y otras enfermedades.

1.2 SÍNDROMES DE TRISTEZA

Existen tres síndromes asociados a esta enfermedad, el primero y sin duda el más importante es la "tristeza" propiamente dicha, decaimiento o marchitez de casi todas las especies de cítricos, excepto el limonero (*Citrus limon* (L.) Burm.f.), cuando están injertadas sobre naranjo amargo o limonero. Un segundo síndrome es la aparición de estrías en la madera ("stem pitting") de algunos cultivares de pomelo y naranjo dulce en determinados países y lima mejicana, independientemente del patrón en el que se encuentran injertados. En lima mejicana se produce un aclareamiento discontinuo de venas frecuentemente acompañado de acanaladuras en la madera al igual que en el caso de *C. macrophylla* (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Roistacher, 1991; Cambra y Moreno, 2000). Existe un tercer síndrome denominado clorosis de plantas francas, el cual puede ocurrir en naranjo agrio, limonero o pomelo y es conocido como amarillez de plántulas o "seedling yellows", que normalmente se da bajo condiciones de invernadero (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

Algunos autores se refieren a estos síndromes como enfermedades distintas (Bar-Joseph *et al.*, 2002; Hilf *et al.*, 2005).

1.2.1 Decaimiento rápido o lento

Es el daño más conocido de la tristeza y causado por un problema de incompatibilidad inducida en las plantas afectadas. El decaimiento se caracteriza por una clorosis y defoliación de los árboles, asociado a una severa pudrición de raicillas y a una pérdida de material de reserva a nivel del tejido cortical bajo la zona de unión del injerto. Estos síntomas externos son provocados por un aumento progresivo del floema no funcional, tanto en la variedad como especialmente en el patrón amargo. Cuando la cantidad de floema funcional es insuficiente para nutrir al árbol, éste comienza a decaer paulatinamente. Dependiendo de las condiciones ambientales y del balance entre floema funcional y no funcional, el decaimiento se manifestará de forma crónica o lenta durante meses o años, o en forma aguda (colapso, decaimiento rápido o "quick decline") (Román *et al.*, 2004).

Schneider (1954), describe la necrosis que se produce en los tubos cribosos y los cambios en el floema de árboles afectados de naranjo dulce sobre naranjo agrio. Esto inicialmente produce un efecto de anillado impidiendo el movimiento de nutrientes hacia las raíces, lo que explica la pérdida de reservas de almidón, el posterior decaimiento de raíces y la aparición de síntomas en la parte aérea. El período de incubación que podría transcurrir en el árbol adulto de naranjo puede ser de uno a dos años. Los árboles afectados poseen una forma de reaccionar igual a un anillado experimental o el causado por algún agente como roedor u hongo, los que normalmente no muestran síntomas en su parte aérea sino hasta el transcurso de varios meses desde que se produce la lesión (Drake y Wallace, 1951).

La incompatibilidad inducida se produciría en gran medida asociada a una reacción de hipersensibilidad del portainjerto, es decir, a la producción de necrosis como resultado de la reacción de incompatibilidad. Ello se produce cuando partículas virales que bajan de la variedad infectada se encuentran en la zona de unión del injerto con el portainjerto. El tejido floemático se necrosa, y deja de transmitir fotosintatos hacia las raíces, produciéndose el correspondiente decaimiento del árbol al no haber adecuada renovación de raíces. Aunque es considerada una enfermedad de unión, no se produce el clásico síntoma de línea negra, ya que este virus está restringido al floema, por lo tanto, no existe una muerte generalizada en la zona de unión como ocurre en el caso de otros virus, ej: línea negra del nogal ("black line") causada por *Cherry leaf roll virus* (CLRV)

(Mircetich *et al.*, 1980) o línea café de los *Prunus*, causada por *Tomato ring spot virus* (TomRSV) (Gonsalves, 1995).

Los árboles que decaen lento generalmente muestran, en la cara cambial de la corteza del naranjo agrio, pequeñas punteaduras conocidas como “pinholing” o “pitting” inverso, que corresponden a prolongaciones de los radios medulares que cuando alcanzan la corteza producen perforaciones, mostrando un aspecto esponjoso (Cambra y Moreno, 2000; Román *et al.*, 2004). Esta manifestación no suele ocurrir cuando se produce el colapso.

1.2.2 Acanaladuras en la madera

El otro síndrome que da origen a la enfermedad conocida como acanaladuras de la madera, se caracteriza por la presencia, en cultivares de pomelo, naranjo dulce y otros, de estrías o acanaladuras longitudinales a nivel del xilema con proyecciones puntiagudas de la corteza, las que calzan perfectamente con las cavidades presentes en la madera. Ello conduce a una pérdida de productividad de las plantas afectadas (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Broadbent *et al.*, 1996; Brlansky *et al.*, 2002). En algunas zonas de Asia, África y América del Sur, existen manifestaciones del virus de la tristeza que causan intensas acanaladuras, produciendo daños severos a la variedad independiente del patrón usado. Pueden afectar a lima (*C. aurantifolia* (L.) Swingle), *C. macrophylla*, pomelo, naranjo dulce, pummelo (*C. grandis* (L.) Osbeck) e híbridos de pomelo (Brlansky *et al.*, 2002).

El síntoma de aclaramiento o clorosis discontinua de venas, se manifiesta en algunas especies cítricas, injertadas o francas de pie. Las especies más sensibles a este síndrome son: Lima mejicana (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle), *C. macrophylla*, *C. excelsa*, *C. hiystrix*, *C. yinko*, cidro Etrog (*C. medica* L.) y la lima dulce de Palestina (*C. limettioides* Tan.) (Cambra y Moreno, 2000). De todas las especies, la más sensible es la lima mejicana, y por ello fue seleccionada como planta indicadora en forma simultánea por tres centros distintos (Roistacher, 1995).

1.2.3 Amarillez de plantas francas de pie

La amarillez de plantas francas ("seedling yellows", SY) es considerado como un tercer síndrome asociado al virus de la tristeza (Roistacher y Bar-Joseph, 1984; Garnsey *et al.*, 1987b; Rocha-Peña *et al.*, 1995) y ha sido sólo observado a nivel de campo asociado a: limonero cv. Eureka, naranjo dulce cv. Seville y mandarino cv. Ellendale en Australia (Fraser, 1952), híbridos derivados de pomelo en Japón (Miyakawa, 1987) y en India (M. Cambra, comunicación personal, 2006). En condiciones de invernadero sirve para caracterizar aislados de tristeza (véase apartado 1.5.2).

1.3 AGENTE CAUSAL: EL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS-CTV

1.3.1 Antecedentes taxonómicos

Los primeros en asociar a la enfermedad conocida como tristeza con partículas virales fueron Kitajima *et al.* (1964 y 1965), quienes encontraron y describieron partículas con apariencia de hebra ("thread-like") en tejidos de cítricos afectados por tristeza. Fue posteriormente Price (1966) quien asoció estas partículas infecciosas con células del floema.

La tristeza está causada por el virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*-CTV) que pertenece a la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*. Es un virus filamentoso con viriones flexibles de aproximadamente 2.000 nm de largo por 10 - 12 nm de ancho (Karasev *et al.*, 1995). De hecho es el virus que posee el genoma de RNA más largo de los virus que afectan a las plantas (Manjunath *et al.*, 2000).

1.3.2 Características genómicas y diversidad de aislados

Su genoma está constituido por RNA de cadena simple (ssRNA) de 5,4 - 6,5 x 10⁶ daltons. Este RNA está protegido por una cápsida formada por dos proteínas de 25 y 27 Kda aproximadamente, la primera cubre el 95% de la longitud del virión, mientras que la segunda encapsida los ~630 nt terminales del gRNA, lo que le da la apariencia de una serpiente cascabel (Cambra y Moreno, 2000; Moreno *et al.*, 2007). El genoma es RNA de cadena simple y polaridad positiva de 19.226-19.296 bases, con 12 marcos de lectura

abierta (ORFs) y capacidad para codificar al menos 19 proteínas (Figura 1.1) (Karasev, et al., 1995; Karasev, 2000).

En todos los aislados de CTV analizados hasta la fecha se ha comprobado la presencia de 12 ORFs, que codifican las proteínas de la replicasa, p33, p6, p65, p61, p27, p18, p13, p20 y p23 (Figura 1.1), y zonas no codificantes (UTR) en los extremos 5' y 3' (Moreno et al., 2007). La p6 está propuesta como proteína de anclaje a la membrana, la p65 en una homóloga de la familia HSP70 de chaperonas de plantas, y junto a la p61, p25 y p27 están relacionadas con el ensamblaje del virión. Se ha demostrado, que la p27 inicia la encapsidación desde el extremo 5' (Satyanarayana et al., 2004, Moreno et al., 2007). La proteína p20 se acumula en los cuerpos de inclusión amorfos de células infectadas con CTV (Gowda et al., 2000), y puede ser un factor de patogenicidad, y la proteína p23 que controla la acumulación asimétrica de las cadenas positiva y negativa durante la replicación del RNA de CTV (Satyanarayana et al., 2002) e induce a los síntomas de aclaración de venas

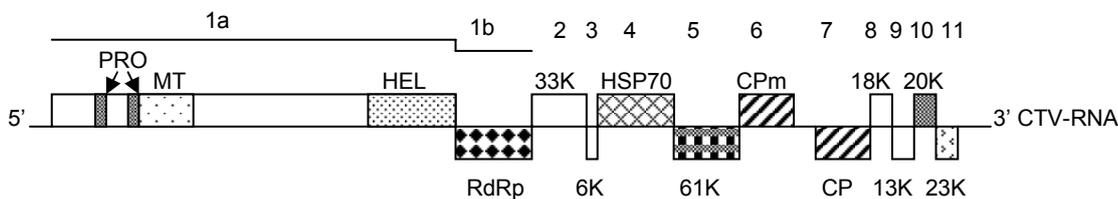


FIGURA 1.1. Representación esquemática del genoma del virus de la tristeza de los cítricos (CTV). Números correlativos indican los 12 marcos de lectura abierta. Las cajas representan los genes y las anotaciones inferiores a los números indican las proteínas que codifican (Fagoaga et al., 2005).

en lima mejicana (Fagoaga et al., 2005). Las proteínas p23, p20 y p25 funcionan como supresoras del silenciamiento de RNA en plantas de *Nicotiana tabacum* y *N. benthamiana* (Lu et al., 2004). Hasta la fecha las funciones de las proteínas p33, p18 y p13 son aún desconocidas (Fagoaga et al., 2005; Moreno et al., 2007).

La permanencia de los cítricos durante años en los campos de cultivo hace posible las múltiples infecciones por pulgones CTV-virulíferos a lo largo del tiempo, y la acumulación de mutaciones y recombinaciones homólogas dan como resultado una mezcla de

diversos genotipos de CTV en las plantas. En plantas infectadas es corriente encontrar diferentes tipos de RNA: las hebras simples ya descritas (ssRNA) y los RNA de doble hebra (dsRNA) que están formados por los RNA subgenómicos (sgRNA) y los RNA defectivos (dRNA) (Manjunath *et al.*, 2000).

Dodds y Bar-Joseph (1983) encontraron dsRNA en plantas infectadas con closterovirus, y las asociaron a formas replicativas de éstos, debido a que el peso molecular de las partículas encontradas era aproximadamente el doble del tamaño del genoma de los ssRNA detectados. Se han detectado dsRNAs en diferentes plantas hospedadoras como: naranjo dulce, naranjo amargo, lima mejicana, pomelo y *C. excelsa*. Naranjo amargo y pomelo fueron los que presentaron los menores títulos de dsRNA (Dodds *et al.*, 1987b).

La replicación y transcripción de gRNA de CTV da lugar a numerosas especies de RNA subgenómico viral en las células infectadas, hecho que facilita los sucesos de recombinación tanto homóloga como no homóloga (Moreno *et al.*; 2007). Recientemente, el análisis de varias regiones genómicas en diversos aislados provenientes de distintos orígenes geográficos y diversas características patogénicas, ha puesto de manifiesto: i) que los sucesos de recombinación son relativamente frecuentes en CTV, ii) que CTV parece haber evolucionado en al menos dos (posiblemente tres) genotipos diferentes. Por otra parte, la recombinación no homóloga es muy frecuente y da origen a los dRNA, que contienen los dos extremos de gRNA pero carecen de una porción de la región central (Moreno *et al.*, 2007). La primera cita que demostró que ocurre recombinación durante la replicación de un closterovirus, fue el trabajo realizado por Mawassi *et al.* (1995), quienes describieron un dRNA aislado de cítricos infectados con el aislado VT de Israel. En este trabajo se clonó y secuenció un prototipo de 2.424 nt, que demostró estar compuesto de 2 regiones genómicas correspondientes a los dos extremos del genoma viral, uno de 1.151 nt (del extremo 5') y otro de 1.259 nt (del extremo 3'), más la presencia de dos réplicas perfectas de 8 nt de origen desconocido.

Se han secuenciado completamente varios aislados de CTV, y en general, de acuerdo con estudios efectuados por investigadores de Israel, España y Estados Unidos, se ha determinado que el extremo 3' del genoma se encuentra altamente conservado (con más del 95% de identidad), mientras que el extremo 5' se encuentra menos conservado (50% de identidad entre algunos aislados) (López, *et al.*, 1998; Manjunath *et al.*, 2000). Por otro lado, López *et al.* (1998), al estudiar el polimorfismo presente en el extremo 5' de la zona no transcrita (UTR), agruparon un total de 9 aislados en 3 grupos distintos, con

porcentajes de identidad superiores a un 88% dentro de cada grupo. Al comparar los aislados españoles (suaves o menos agresivos) con uno de Japón (considerado severo o más agresivo), se pudo establecer que los primeros se ubicaban principalmente en el grupo III, mientras que el de Japón principalmente en el grupo I y II, al igual que la secuencia publicada del aislado T36 considerado como un aislado severo (Karasev *et al.*, 1995).

A pesar de las diferencias descritas en las secuencias del genoma viral de diversos aislados de CTV analizados hasta la fecha, se justifica su clasificación en una sola especie (Manjunath *et al.*, 2000). Algunos autores como Cambra *et al.* (1993), Broadbent *et al.* (1996) y Albiach-Martí *et al.* (2000b), al traspasar un aislado de una planta donante a una receptora mediante pulgones, obtuvieron poblaciones de aislados diferentes y lo explican como segregación de una mezcla de aislados en una población inicial.

En relación con los aislados y los síndromes que estos causan, el síndrome de decaimiento rápido o lento está asociado a aislados de CTV denominados DI ("decline inducing"). El síndrome de acanaladuras de la madera es causado por razas tipo SP ("stem pitting") y es detectado en condiciones de invernadero mediante plantas de pomelo cv. Duncan y/o naranjos dulce cv. Madame Vinous, mientras que el síndrome de amarillez de plántulas, es detectado en naranjo amargo, y es presumiblemente considerado como evidencia de las razas más severas de DI ó SP (Rocha-Peña *et al.*, 1995).

1. 4 PRINCIPALES HOSPEDADORES

La gama de hospedadores del virus de la tristeza está prácticamente restringida a la familia *Rutaceae* y en particular a las especies e híbridos de los géneros *Citrus* y *Fortunella*. El virus también ha sido transmitido a algunas especies de géneros afines a *Citrus* como: *Aegle*, *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Atalantia*, *Citropsis*, *Clausena*, *Clymenia*, *Eremocitrus*, *Fortunella*, *Hesperthusia*, *Merrillia*, *Microcitrus*, *Pamburus*, *Pleiospermium*, *Severinia* y *Swinglea* (Yoshida, 1996; Cambra y Moreno, 2000).

Existen antecedentes de la replicación de CTV en otras familias, por ej: *Passifloraceae*, aunque esto ha sido el resultado de inoculaciones en forma experimental. El primero en informar sobre infecciones en el género *Passiflora* fue el Dr. Arturo Osoreo, fitopatólogo del Perú (Müller *et al.*, 1974), y basados en este antecedente, estos autores inocularon 10

especies de este género logrando infectar 5 con CTV mediante el empleo de *T. citricida* como vector. Así mismo, lograron traspasar CTV desde *P. gracilis* a una planta de lima Galego empleando el mismo vector. Posteriormente, Roistacher y Bar-Joseph (1987b), lograron traspasar mediante *A. gossypii* CTV a plantas del género *Pasiflora*, aunque sólo *P. gracilis* y *P. caerulea* fueron capaces de multiplicar el virus, que incluso indujo en ambas especies, clorosis y enanismo, y la muerte en el caso de *P. gracilis*.

Se conocen antecedentes de la resistencia a nivel de campo que presentaban árboles infectados sobre la especie *P. trifoliata* que sobrevivieron al ataque de CTV, tanto en Australia (1860) como en Sudáfrica (1899) (Cambra y Moreno, 2000). Posteriormente autores como Kitajima (1964) y Tanaka *et al.* (1971) citados por Garnsey *et al.* (1987a), reportan que plántulas de esta especie resultaron ser resistentes o inmunes a la infección por CTV. Aunque existen antecedentes de ser susceptible a algunos aislados (Yoshida, 1996). El alto grado de resistencia o inmunidad de 7 selecciones de *P. trifoliata* y de *Severinia buxifolia* fue confirmado mediante ELISA (Garnsey *et al.*, 1987a). Posteriormente, estudios genéticos han demostrado la presencia de al menos dos genes distintos asociados a la resistencia genética de *P. trifoliata* a CTV, denominados *Ctr* y *Ctm* (Mestre *et al.*, 1997). Aparentemente, la resistencia de esta especie se debería a que impide el movimiento de CTV, ya que éste se replica bien en protoplastos de *P. trifoliata* (Albiach-Martí *et al.*, 2004). Por otro lado, algunos tipos de *Fortunella* y pumelo tienen genes de resistencia frente a algunas cepas (Cambra y Moreno, 2000).

Mediante la realización de análisis genéticos de cruces entre trifoliados susceptibles y tolerantes, se ha sugerido que sólo un par de genes recesivos estarían involucrados en la susceptibilidad (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

1.5 DIAGNÓSTICO: DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE AISLADOS DE CTV

1.5.1 Detección de CTV. Técnicas biológicas, serológicas y moleculares

Tradicionalmente se ha utilizado la sintomatología para detectar el virus de la tristeza. No obstante, CTV no puede ser diagnosticado por simple sintomatología en campo ya que el decaimiento, más o menos rápido, que produce en árboles injertados sobre el patrón naranjo amargo no es específico. Además, son frecuentes casos de infección sin

manifestar síntomas externos y, por supuesto, cualquier árbol injertado sobre patrones tolerantes al síndrome de tristeza escaparía al diagnóstico visual (Cambra, 1983).

La presencia de punteaduras en la parte interna de la corteza del patrón amargo ("inverse stem pitting") justo por debajo de la línea de injerto, indica en algunas condiciones la presencia del virus de la tristeza (Wallace, 1978). Sin embargo, estas punteaduras en la corteza no constituyen un síntoma específico de CTV, ya que la enfermedad de "Stubborn" causada por *Spiroplasma citri* y estreses abióticos también lo pueden inducir (M. Cambra, comunicación personal, 2007).

El diagnóstico de CTV por métodos biológicos de invernadero o de laboratorio es imprescindible. El procedimiento clásico de detección del virus es la inoculación mediante injerto de material sospechoso en lima mejicana (Wallace y Drake, 1951). La observación de síntomas de aclaramiento de venas, acucharamiento de hojas y acanaladuras en la madera, puede ser observada tras un período de cultivo que varía de 2 a 6 meses en condiciones controladas de invernadero, es decir temperaturas que oscilen entre 24 a 28°C como máximo durante el día y 17-21 como mínimo durante la noche (Roistacher, 1991). La prueba biológica de la lima mejicana es muy sensible, aunque se han descrito aislados como el K, que no induce reacción en la misma (Albertini *et al.*, 1988; Bové *et al.*, 1988). Además, patotipos débiles sobre la propia lima son detectados con dificultad. El inconveniente de la prueba biológica de la lima mejicana es la lentitud en el diagnóstico, su elevado coste y la imposibilidad de ser usada a gran escala (Cambra, 1983).

También se ha empleado la microscopía electrónica combinada con la detección en lima mejicana (Bar-Joseph *et al.*, 1974). Estos autores describieron la realización de inoculaciones múltiples, de cinco a diez muestras en una misma planta de lima, y en caso de ser positiva la prueba, el árbol o árboles de campo contaminados, eran identificados mediante microscopía electrónica.

Otra prueba para el diagnóstico de CTV consiste en la observación de para cristales o inclusiones del virus (Garnsey *et al.*, 1980). No se trata de una técnica sensible y no puede ser aplicada a gran escala, pero es una prueba sencilla y económica.

Los primeros intentos de utilizar métodos de laboratorio que permitieran una detección rápida y económica del virus mediante técnicas serológicas comenzaron con los trabajos

de Primo *et al.* (1971). La baja calidad de los antisueros obtenidos no permitió que prosperasen los métodos de inmunodifusión e inmunolectroforesis propuestos. La obtención de antisueros de buena especificidad permitió a Gonzalves *et al.* (1978) poner a punto la inmunodifusión doble en agar conteniendo dodecil sulfato sódico (SDS) y aplicarla a la detección de CTV (Garnsey *et al.*, 1979). La verdadera revolución en los métodos de diagnóstico de CTV, se produjo con la puesta a punto de la técnica inmunoenzimática "Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (ELISA) por Bar-Joseph *et al.* (1979) y Cambra *et al.* (1979), haciendo posible el análisis rutinario de numerosas muestras en prospecciones a gran escala, tanto para el control de CTV a nivel de vivero como en estudios epidemiológicos (OEPP/EPPO, 2004). La producción de anticuerpos monoclonales específicos de CTV (Vela *et al.* 1986; Gumpf *et al.* 1987, Tsai *et al.*, 1991; Permar *et al.*, 1990; Zebzami *et al.*, 1993; Batista *et al.* 1994), resolvió problemas de especificidad e incrementaron la sensibilidad de la técnica ELISA (OEPP/EPPO, 2004). La mezcla de los dos anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 o de sus versiones recombinantes (Terrada *et al.*, 2000), reconoce a todos los aislados de CTV analizados (Cambra *et al.*, 1990). Una detallada descripción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales ha sido reportada por Cambra *et al.* (2000a).

El desarrollo de inmunopresión-ELISA, o "tissue print-ELISA" o "direct tissue-blotting immunoassay" (DTBIA) (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b), para detección de CTV en secciones de material vegetal impreso en membranas de nitrocelulosa, ha permitido el análisis sensible de miles de muestras de una manera simple y sin necesidad de preparar extractos. Inmunopresión-ELISA es el método recomendado por la Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas (OEPP/EPPO, 2004), tras su validación en comparación con otras técnicas de detección de CTV (Cambra *et al.*, 2002).

Se han desarrollado técnicas moleculares basadas en PCR con inmunocaptura (Nolasco *et al.*, 1993) o impresión o escachado captura (Olmos *et al.*, 1996; Cambra *et al.*, 2000 c). También se ha desarrollado una PCR anidada en un solo tubo (Olmos *et al.*, 1999), que ha permitido la detección de CTV en un único pulgón o en material vegetal. Un sistema de PCR cooperativa (Co-PCR) utilizando una sonda universal para hibridación con los productos de PCR (Olmos *et al.*, 2002) ha sido descrito con una sensibilidad similar a la de PCR anidada en un solo tubo, para detección universal de CTV. La técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real ha sido desarrollada recientemente (Bertolini *et al.*, 2008) y permite la detección sensible y cuantitativa de cualquier aislado de CTV en material

vegetal o en pulgones, sin necesidad de realizar extracciones de RNA. El método de RT-PCR a tiempo real, y algunas variantes en la preparación de muestras ("squash", "spot" y "print") están siendo validados con muestras vegetales para su inclusión en protocolos oficiales.

Se ha elaborado un protocolo de diagnóstico de CTV basado en técnicas biológicas, serológicas y moleculares (OEPP/EPPO, 2004). En este protocolo se recoge el sistema de muestreo y de preparación de las muestras para su análisis y se describen las pruebas biológicas, serológicas y moleculares validadas en "ring tests". La prueba biológica recomendada es el uso de lima mejicana en las condiciones estándar descritas por Roistacher (1991). Los análisis serológicos recomendados son: inmunopresión-ELISA (Cambra *et al.*, 2000b) utilizando la mezcla de anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 y el protocolo descrito en OEPP/EPPO (2004), comercializado por PlantPrint Diagnostics. ELISA-DAS convencional o biotina/estreptoavidina con los anticuerpos monoclonales anteriores o con los anticuerpos policlonales comerciales validados (OEPP/EPPO, 2004) y según protocolo descrito por Garnsey y Cambra (1991). Las pruebas moleculares recomendadas en el protocolo OEPP/EPPO (2004) son: Inmunocaptura RT-PCR según Nolasco *et al.* (1993) e inmunocaptura RT-PCR anidado en un solo tubo cerrado según Olmos *et al.* (1999). El protocolo exige para primeras detecciones o en casos críticos de importación/exportación resultados positivos en dos métodos diferentes, ya sean biológicos y serológicos, biológicos y moleculares o serológicos y moleculares, mientras se efectúen con los protocolos y reactivos validados por OEPP/EPPO (2004). Una actualización de este protocolo, incluyendo técnicas de RT-PCR a tiempo real, se está realizando para FAO con el fin de disponer de un protocolo consensuado internacionalmente, en el que también se incluyen pruebas biológicas para estimar la agresividad de un aislado.

1.5.2 Caracterización de CTV

Los síntomas presentes en árboles infectados difieren considerablemente en distintas situaciones, pues dependen de la sensibilidad del hospedador, de las condiciones climáticas y de la naturaleza patogénica del virus (Shalitin *et al.*, 1994). Por esto el proceso de caracterización de razas se debe llevar a cabo, en condiciones controladas de invernadero realizando la detección e identificación de los diferentes aislados implicados (Garnsey *et al.*, 1987b).

A partir de trabajos realizados en tres laboratorios diferentes (Riverside, California, Orlando, Florida y Beltsville, Maryland), se desarrolló una evaluación estandarizada de las características biológicas (SHR) de CTV, con el objetivo de disponer de una metodología para la caracterización de aislados de tristeza en diferentes áreas (Garnsey *et al.*, 1987b, 1991 y 2005). En una primera etapa se analizaron un total de 36 aislados, provenientes de diferentes países, siendo la mayoría de éstos purificados mediante pulgones. Las muestras evaluadas mediante el uso de cinco hospedadores diferentes, que presentan sensibilidad diferencial al virus, permitió caracterizar la mayor cantidad de propiedades biológicas de las razas de CTV analizadas, y así darles un único valor que exprese su severidad (Garnsey *et al.*, 1987b). Por otro lado, en forma paralela, se desarrolló un proyecto conducente a formar una colección de aislados de CTV de diferentes regiones a nivel mundial. Esta colección se encuentra ubicada en Beltsville, Maryland, EEUU (Garnsey *et al.*, 1991), y hasta la fecha se han logrado caracterizar mediante SHR un total de 266 aislados de CTV procedentes de 30 países (Garnsey *et al.*, 2005).

Por medio de la comparación de las reacciones de diferentes plantas hospedadoras, se han pronosticado 11 probables patrones de reacción, y se han colectado aislados caracterizados correspondientes al total de éstos (Garnsey *et al.*, 2005). Además, Hilf *et al.* (2005) aplicaron marcadores moleculares y ampliaron a 13 el número de perfiles cuando analizaron 131 aislados procedentes de diferentes países.

Actualmente, el único procedimiento confiable para la caracterización de razas severas de CTV capaces de provocar "seedling yellows" (CTV-SY) y "stem pitting" (CTV-SP) son las pruebas biológicas efectuadas en condiciones de invernadero (Garnsey *et al.*, 1987b; Broadbent *et al.*, 1996). Si bien el método de caracterización empleado se correlaciona bien con la información previa de severidad de los aislados, tiene el inconveniente de que requiere mucho tiempo para la aparición de los síntomas y es costoso (Garnsey *et al.*, 1987b; Cambra y Moreno, 2000).

En las propiedades biológicas se han observado diferencias en cuanto a la severidad de síntomas en plantas de campo (Roistacher y Moreno, 1991), plantas indicadoras (Garnsey *et al.*, 1987b), la transmisibilidad por pulgones vectores (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988b), filtración por hospedadores (Moreno *et al.*, 1993) y capacidad de protección cruzada frente a aislados más severos (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

Hasta la fecha, se ha reportado la presencia de los aislados más severos capaces de causar daño en pomelo y en naranjo dulce en Brasil, Japón, Sudáfrica, Venezuela, Perú, Australia, entre otros (Roistacher, 1988; Roistacher y Moreno, 1991; Rocha-Peña *et al.*, 1995, Broadbent *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000).

Otro tipo de caracterización es la serológica. Como criterio para diferenciar razas se ha utilizado la concentración de virus en términos de densidad óptica (DO) obtenida mediante ELISA o la utilización de diferentes anticuerpos monoclonales (Mabs) (Vela *et al.*, 1986; Gumpf *et al.*, 1987; Permar *et al.*, 1990; Tsai y Su, 1991; Nikolaeva y Karasev, 1998), los cuales son específicos de un epítipo determinado y por lo tanto pueden detectar variaciones entre distintos aislados de virus (Cambra *et al.*, 1991a y 1991b; Kano *et al.*, 1991; Tsai y Su, 1991; Nikolaeva y Karasev, 1998).

A pesar de que se han obtenido anticuerpos monoclonales capaces de discriminar entre aislados, únicamente el MCA 13 (Permar *et al.*, 1990; Permar y Garnsey, 1991), es capaz de discriminar aislados de CTV de diferente comportamiento biológico. La diferenciación serológica de aislados constituye un método rápido, económico y simple, pero sus principales limitaciones radican en que se requiere una amplia batería de anticuerpos monoclonales y que la información que brinda esta metodología se refiere sólo a la proteína de cubierta (que es el antígeno que se utiliza habitualmente para producir los anticuerpos) la que apenas representa el 3% del genoma viral. Además, la capacidad patogénica de cualquier variante de CTV no está necesariamente relacionada a variaciones en la proteína de la cubierta (Roistacher y Moreno, 1991). No obstante, uno de los métodos no biológicos más indicativos para discernir entre aislados agresivos y aislados suaves, es la reacción frente al anticuerpo monoclonal MCA 13 (Permar y Garnsey, 1991).

Para la caracterización molecular de CTV se ha utilizado la reacción con distintos anticuerpos monoclonales y el análisis de mapas peptídicos generados con endoproteasas. También el análisis de RNA bicatenario, que consiste en la extracción formas replicativas de dsRNA en plantas infectadas con CTV, que posteriormente se hace migrar en gel de poliacrilamida y se obtiene un perfil electroforético. Para la aplicación de ésta técnica es necesario realizar extractos con al menos 4-5 g de corteza de brotes en crecimiento activo, y resulta engorrosa para la caracterización de rutina de CTV.

En general, el análisis de RNA bicatenario ha sido utilizado sobre todo para la caracterización de aislados de CTV, especialmente mediante el empleo de plantas de naranjo dulce, cidro y lima mejicana, pero no ha sido posible correlacionar los perfiles electroforéticos con las características patogénicas de los distintos aislados (Dodds y Bar-Joseph, 1983; Moreno *et al.*, 1993). Sí ha sido posible establecer variaciones en la patogenicidad de los aislados al ser trasplantados desde una planta a otra mediante injerto, generando subaislados, lo que se ha traducido en un cambio en los perfiles de dsRNA en algunos de los sub-aislados obtenidos. Esto indicaría que muchos aislados de CTV son en realidad mezclas, observándose en algunos trasplantes la pérdida de algunas de éstos o su disminución a títulos no detectables (Moreno *et al.*, 1993). Hoy en día se sabe que las bandas diferenciales de dsRNA de distintos aislados corresponden a d-RNAs (P. Moreno, comunicación personal, 2007). La acumulación de algunos RNAs defectivos podría modular la expresión de síntomas como ocurre en otros virus, aunque esta posibilidad no está plenamente demostrada en CTV (Moreno *et al.*, 2007).

Otro análisis corresponde a la hibridación molecular con sondas de DNA ó RNA complementario. Se pueden diferenciar y caracterizar razas de CTV si se dispone de sondas de diferente especificidad (Narváez *et al.*, 2000). El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o el análisis del polimorfismo de conformación del DNA monocatenario (SSCP) de distintos genes, también ha sido utilizado (Rubio *et al.*, 1996; Gago-Zachert *et al.*, 1999). Sin embargo, ninguno de estos procedimientos permite predecir el comportamiento patogénico de los aislados, aunque sean capaces de diferenciar entre si aislados concretos de CTV (Cambra y Moreno, 2000).

A partir de la secuenciación de aislados de CTV, y del hecho que el extremo 5' de la partícula viral presenta mayores divergencias, Hilf y Garnsey (2000) propusieron una clasificación y caracterización molecular de los aislados de CTV, mediante RT-PCR con iniciadores múltiples. Esta propuesta se basa en el empleo de regiones divergentes de los genomas de aislados tipo: T3, T30, T36 y VT como iniciadores de PCR. Así establecieron 14 genotipos diferentes. Posteriormente, Hilf *et al.* (2005), al realizar un análisis más amplio que involucró 372 aislados de CTV procedentes de diferentes países, lograron determinar que sólo parte de éstos pudo ser catalogado como correspondientes a un aislado-tipo, 51 de éstos correspondieron a infecciones mixtas y 55 no pudieron ser clasificados.

La secuenciación es sin duda el método más completo para caracterizar (Yang *et al.*, 1999), pero es un método relativamente lento y oneroso. Se ha publicado la secuencia completa de al menos 9 aislados: T30 (aislado suave) (Albiach-Martí *et al.*, 2000a), T36 (DI) de Florida (EEUU) (Karasev *et al.*, 1995), VT (DI) de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), SY568 (DI y SP) de California (EEUU) (Yang *et al.*, 1999), T385 (aislado suave de España) (Vives *et al.*, 1999), NUagA (aislado suave de Japón) (Suastika *et al.*, 2004), Qaha de Egipto (GenBank Accession N° AY340974), un aislado de México (SP y DI) (GenBank Accesoión N° DQ272579) y el T318A de España (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2006).

1. 6 EPIDEMIOLOGÍA

El virus de la tristeza puede ser transmitido desde plantas enfermas a plantas sanas mediante injerto con material infectado, a través de pulgones vectores del virus, y experimentalmente en forma mecánica (Garnsey y Müller, 1986). Es importante señalar que CTV no se transmite por semilla (Roistacher, 1991).

1.6.1 Transmisión por injerto

La primera demostración de la transmisibilidad de la enfermedad de la tristeza por injerto se debe a Fawcett y Wallace (1946). En un ensayo de campo, se inocularon 100 plantas de naranjo dulce cv. Valencia injertadas sobre naranjo amargo, dejándose 100 plantas testigo sin inocular. A los dos años de realizado el ensayo, el 86% de las plantas inoculadas habían declinado.

Sin embargo, la evidencia de diagnóstico biológico se produjo en forma simultánea en centros de investigación de: Brasil, California (EEUU) y Sudáfrica, cuando se desarrolló el "indexing" o pruebas biológicas en base al uso de lima mejicana como planta indicadora, lo que permitió un avance considerable en el diagnóstico de esta enfermedad (Roistacher y Gumpf, 1986). La prueba se basa en la inoculación de CTV mediante injerto.

1.6.2 Transmisión mecánica experimental

Garnsey *et al.*, (1977) fueron los primeros en transmitir CTV en forma mecánica mediante el empleo de cuchillas. El virus fue transmitido en forma mecánica en 16 de 120 intentos y al utilizar extractos de corteza de árboles infectados en 20 de 67 intentos. Posteriormente, Garnsey y Müller (1986) reportaron la transmisión mecánica de CTV a partir de inóculo concentrado en un gradiente de sacarosa. La banda rica en partículas virales se inoculó realizando cortes mediante una hoja de bisturí en plantas hospedadoras apropiadas.

1.6.3 Transmisión por pulgones

Hermoso de Mendoza *et al.* (1984), publicaron una lista con las especies de pulgones que transmiten CTV y quienes los determinaron, entre los cuales se encuentran: *Toxoptera citricida* (Kirk.), descrito por primera vez en Brasil por Meneghini (1946); *Aphis gossypii* (Glover), determinado en California, EEUU por Dickson *et al.* (1951); *A. spiraecola* (van der Goot), reportado en Florida, EEUU por Norman y Grant (1953), *T. aurantii* (Boyer de Fons.), descrito en Florida, EEUU por Norman y Grant (1956) y *A. craccivora* (Koch), determinado en India en 1965 por Varma *et al.* (1965). Todos estos pulgones transmiten el virus en forma semi-persistente, no circulativa, con un período de adquisición que varía de algunos segundos hasta una hora, pudiendo ser transmitido por 24 a 48 horas después de ser adquirido (Rocha-Peña *et al.*, 1995; Cambra *et al.*, 2000a y 2000b).

La especie *T. citricida* ha sido y es la principal responsable de la dispersión de CTV y por tanto de la muerte de millones de árboles en Brasil y Argentina, encontrándose actualmente dispersa entre los diferentes países citrícolas de Asia, África, Oceanía, y de América, en donde ha alcanzado países del Caribe como Cuba, la península de Yucatán en México y el estado de Florida en Estados Unidos (Yokomi *et al.*, 1994; Halbert y Brown, 1998; Cambra *et al.*, 2000a). Por otro lado, se encuentra al sur del desierto del Sahara, en la península Arábiga, en las islas Madeira de Portugal y norte de Portugal continental y en toda la cornisa Cantábrica española (Cambra, comunicación personal, 2006), amenazando la citricultura del Mediterráneo. Esta especie es considerada por diferentes expertos como la más eficaz en transmitir cualquier tipo de aislado de CTV, incluso razas severas capaces de inducir el síndrome de acanaladuras en la madera en naranjo dulce (Broadbent *et al.*, 1996). Su eficacia en transmitir razas agresivas la convierten en el vector más peligroso de CTV.

Por otro lado, *A. gossypii* fue el vector responsable de los severos daños producidos en España, Israel, y California y Florida (EEUU), por lo que en países donde *T. citricida* no se encuentra presente, *A. gossypii* se constituye en el principal insecto vector (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973; Roistacher, 1981; Yokomi y Garnsey, 1987; Cambra *et al.*, 2000a y Marroquín *et al.*, 2004).

En España, se han citado nueve especies de pulgones que visitan a los cítricos, pero sólo tres de ellos se han mostrado como vectoras de CTV: *A. gossypii*, *T. aurantii* y *A. spiraecola* (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984 y 1988b).

Un aspecto que ha sido abordado por numerosos investigadores, se refiere a la eficiencia de transmisión de las diferentes especies de pulgones vectores. Sin embargo, los resultados obtenidos por los diferentes autores no son del todo comparables, ya que la eficiencia va a depender del tipo de aislado a transmitir, la metodología empleada, referida a número de individuos empleados y horas empleadas en la adquisición y transmisión a la planta receptora, tipo de planta receptora, entre otros aspectos (Raccah, *et al.*, 1976; Yokomi y Garnsey, 1987; Hermoso de Mendoza, *et al.*, 1988 a y b).

Dickson *et al.* (1951), realizaron estudios de transmisión inoculando plantas de naranjo dulce injertadas sobre naranjo amargo. Demostraron que *A. gossypii* era capaz de transmitir aislados de CTV desde árboles con síntomas de decaimiento, y lograron reproducir síntomas de decaimiento en árboles pequeños al cabo de 3 a 12 meses, mientras que árboles de mayor tamaño decaían al cabo de 15 a 30 meses.

Los primeros ensayos de transmisión demostraron la mayor eficiencia que posee *T. citricida* para transmitir las diferentes razas de CTV (Costa y Grant, 1951; Dickson *et al.*, 1951). Sin embargo, trabajos efectuados por Bar-Joseph y Loebenstein (1973) demostraron cambios en la transmisibilidad de CTV por *A. gossypii*, de 2-5% (obtenidos por los aislados ST y CT de CTV) a un 40,7% (obtenido por el aislado VT de SY-CTV), lo que les permitió inferir que esta sería la causa primaria de la dispersión natural de la enfermedad en Israel. Una situación similar ocurrió en California, EEUU, en donde Dickson *et al.* (1956), habían determinado eficiencias de transmisión de 5-6%, aumentando a eficiencias del 100% obtenidas 25 años más tarde para aislados del tipo CTV-SY. Este cambio fue atribuido por Roistacher y Bar-Joseph (1987a) como una posible causa de la dispersión de aislados severos en el centro y sur de California (EEUU).

Por otro lado, Yokomi y Garnsey (1987) al comparar la eficacia transmisora de *A. gossypii* y *A. citricola* (hoy *A. spiraecola*), encontraron que la primera especie era 3 veces más eficaz que la segunda en transmitir aislados de CTV. Estos estudios reportan una alta eficiencia de transmisión de aislados de CTV lo que se correlaciona con aumentos también en la dispersión de aislados en Florida, EEUU (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Un hecho similar ha sido reportado en California, EEUU por Roistacher y Gumpf (1986). Experimentos en España, señalan una eficiencia de transmisión de 6% para *A. spiraecola*, mientras que el mismo aislado fue transmitido con un 78% de eficiencia mediante el pulgón del melón *A. gossypii* (Hermoso de Mendoza *et al.*, 1988a). Este aspecto no debe ser considerado en forma aislada, ya que existen estudios que han demostrado, que si bien *A. spiraecola* es menos eficiente que *A. gossypii*, era hasta 45 veces más abundante que este último en Florida, EEUU (Yokomi y Garnsey, 1987). Una situación similar ocurrió en California, en donde la especie de áfido más comúnmente observada tras tres años de estudio, fue *A. spiraecola* (Yokomi y Oldfield, 1991).

En España, Hermoso de Mendoza *et al.*, (1988a), encontraron que *A. gossypii* era capaz de transmitir aislados correspondientes a una raza suave y severa con eficiencias de transmisión de 78 y 26%, respectivamente. De hecho Cambra *et al.* (2000a) han atribuido la dispersión de CTV en los últimos años en España a la mayoritaria presencia de *A. gossypii*, también señalada por Marroquín *et al.* (2004). Por otro lado, Yokomi *et al.*, (1994) compararon cuatro aislados, provenientes de Brasil, España, Israel y Estados Unidos (Hawaii). *T. citricida* (Kirk.) resultó ser entre seis y 25 veces más eficiente en transmitir estos aislados en comparación con *A. gossypii*, cuando se utilizó un solo individuo en la transmisión.

Si bien *A. gossypii* ha sido capaz de transmitir aislados suaves con igual eficiencia que *T. citricida*, este último es considerado el vector capaz de transmitir con mayor eficacia que los demás pulgones a los aislados más agresivos de CTV, que pueden causar síntomas de severas depresiones en la madera, en pomelo o en naranjo dulce. Este tipo de aislados ha dado origen a importantes epidemias en Sudáfrica, Brasil, Venezuela, Perú y Australia (Wallace, 1978; Broadbent *et al.*, 1996; Cambra y Moreno, 2000). En general, la dispersión de este tipo de aislados ha estado relacionada a *T. citricida*. Por otro lado, en 1997, dos años después de la introducción de pulgón café en el estado de Florida (EEUU), se observó una epidemia de DI con un rápido decaimiento de las plantas, atribuible a este vector al propagar aislados más agresivos. Sin embargo, la incidencia y dispersión de aislados del tipo SP no ha sido reportada hasta la fecha (Halbert *et al.*, 2004).

1.6. 3.1 Patrón de la distribución espacio-temporal de CTV

Entre los factores que determinan la velocidad de dispersión de CTV, se encuentran la densidad de población y hábitos de vuelo de los vectores, la densidad del inóculo, las especies de cítricos predominantes y la intensidad y duración de la brotación (Cambra y Moreno, 2000). Se ha determinado que la composición de las poblaciones de pulgones vectores, altera la evolución del patrón de distribución espacial del virus, afectando la diseminación y transmisión de CTV (Gottwald *et al.*, 1999).

Por otro lado, Cambra *et al.* (2000a) al realizar un análisis global de la tristeza en España, se observaron que mientras *A. spiraecola* predominó en cítricos, la dispersión de CTV se mantuvo en un ritmo bajo, sin embargo esta situación se aceleró alcanzando la curva su fase exponencial, cuando comenzó a predominar *A. gossypii*. Esta situación ocurre hasta la fecha, con especies de pulgones que visitan las fincas en proporciones relativas de: *A. gossypii*, 53%; *A. spiraecola*, 32% y *T. aurantii*, 11% (Marroquín *et al.*, 2004), determinados mediante la metodología del brote pegajoso.

Diversos autores han demostrado que *A. gossypii* y *T. citricida* difieren en la distribución espacial y temporal de esta enfermedad (Gottwald *et al.*, 1998; Cambra *et al.*, 2000a). Cuando *A. gossypii* está presente en una zona determinada, la incidencia del virus progresa desde niveles bajos (5%) a altos (95%) en lapsos de ocho a 15 años y sus movimientos son predominantemente hacia árboles distantes (normalmente situados a 4 ó 6 árboles de distancia), lo cual resulta en una distribución difusa o al azar de CTV en la plantación. Por otro lado, cuando predomina *T. citricida*, los mismos incrementos ocurren en períodos de dos a cuatro años y la dispersión es hacia los árboles inmediatamente adyacentes, lo que provoca una aparición más agregada de la enfermedad en el campo, lo cual hace que se manifieste en forma de manchas (Gottwald *et al.*, 1996b, 1998 y 1999).

En España, se han realizado estudios sobre la distribución espacial y temporal de CTV. Las prospecciones de CTV se efectuaron mediante técnica de ELISA con anticuerpos monoclonales, por períodos superiores a 12 años, en seis zonas ecológicas distintas con cultivos de naranjos y pomelos injertados sobre citrange Troyer y/o Carrizo. Se determinó que el modelo no lineal de Gompertz fue el más apropiado para correlacionar incidencias observadas *versus* los valores esperados (Cambra *et al.*, 2000a). En España el patrón de dispersión mostró que había poca evidencia de agregación de los árboles

infectados con CTV, y el patrón espacial no pudo ser diferenciado de un patrón al azar (Gottwald *et al.*, 1998). Sin embargo, en estudios efectuados en dos huertos adyacentes, uno de naranjo dulce y el otro de clementino, que fueron analizados anualmente durante 19 años, el progreso temporal siguió el modelo matemático de Gompertz en clementina, mientras que en el huerto de naranjo dulce estuvo mejor representado por el modelo logístico (Cambra *et al.*, 2000a). Las diferencias son explicadas por estos autores en relación a una mayor preferencia de los pulgones por los árboles de clementino, y por la mayor presencia de brotes suculentos en esta especie, que es más visitada que otras (Marroquín *et al.*, 2004).

CTV fue monitoreado durante cuatro años por Gottwald *et al.* (1998) en Costa Rica y República Dominicana y establecieron los patrones de dispersión de CTV tras la introducción de *T. citricida*. El modelo no lineal Gompertz fue seleccionado para describir el incremento temporal. Por otro lado, el índice beta-binomial de dispersión en cuadrantes de diversos tamaños sugirió la agregación de árboles infectados por CTV, típica de la presencia de *T. citricida*.

Las fluctuaciones en las poblaciones del pulgón vector y las diferencias en las tasas de transmisión del CTV, pueden ser responsables de los cambios en el tiempo de la incidencia de CTV, con lo cual a menudo se puede pasar de una curva suave de progreso de la enfermedad, a un aumento más brusco de ésta en el tiempo (Gottwald *et al.*, 1996b).

Los estudios epidemiológicos han generado la información base para la toma de decisiones, y así diseñar estrategias para reducir las tasas de infección, y desarrollar modelos predictivos del desarrollo de la tristeza. En España, los estudios epidemiológicos y un conocimiento preciso de la incidencia y dispersión de CTV en diferentes áreas de la Comunidad Valenciana, han permitido emitir recomendaciones para efectuar el cambio hacia una citricultura moderna, basada en el empleo de variedades certificadas injertadas en portainjertos tolerantes a CTV. Sin embargo, la investigación debe continuar a modo de desarrollar herramientas apropiadas para el control de posibles nuevos brotes en el futuro debido a la emergencia y/o introducción de aislados severos (Cambra *et al.*, 2000a) y por el riesgo de introducción de *T. citricida*.

1.7 ESTRATEGIAS DE CONTROL

Considerando la naturaleza viral de la enfermedad de la tristeza, los países productores de cítricos deben adoptar diversas medidas o estrategias, para evitar importantes pérdidas en plantaciones comerciales. El primer control importante es el de cuarentena, es decir, evitar que ingrese el patógeno a un país o localidad mediante medidas regulatorias que impidan el ingreso de material vegetal infectado. Si este control falla, se podrían adoptar medidas de exclusión o erradicación. Una vez que CTV ha ingresado a un país o región, la certificación y el empleo de portainjertos tolerantes o resistentes a este virus son las estrategias adecuadas. Finalmente en caso de existir una dispersión a nivel de campo de aislados agresivos que limiten la producción por sus daños y que sean imposibles de erradicar, la estrategia a emplear sería el uso de protección cruzada. En el futuro, se vislumbra contar con mejora genética de variedades mediante biotecnología.

1.7.1 Control por cuarentena y exclusión

En un país donde no se encuentra presente CTV, una estrategia importante es el empleo de barreras fitosanitarias que impidan el ingreso de material de cítricos infectado. Es así como los países poseen medidas regulatorias y cuarentenarias que impiden o regulan la introducción de material vegetal a una región dada.

Con el propósito de introducir de forma segura nuevas variedades de cítricos a un país, el programa de Cuarentena de España (Navarro *et al.*, 1984; Navarro, 1993) es un modelo de referencia para muchos países citrícolas. Consiste en la introducción de material a través de varetas que son inspeccionadas. Si éstas se encuentran exteriormente contaminadas son destruidas, mientras que las varetas que pasan la inspección preliminar, se desinfectan superficialmente y se cultivan *in vitro* a temperatura y luminosidad adecuadas, para inducir brotación de yemas axilares o laterales. Los brotes resultantes se utilizan para realizar microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (Navarro *et al.*, 1975). Este material es cultivado en medio líquido estéril, por espacio de 60 días, para proceder luego a su cultivo bajo condiciones controladas de invernadero, siendo mantenidas las plantas por espacio de dos años. El resto del material es debidamente autoclavado y eliminado. Durante el transcurso de este período, las plantas son analizadas, y si se encuentra algún patógeno, pueden ser eliminadas o reinjertadas de acuerdo a la importancia o interés del cultivar introducido. Si al cabo de este período las

plantas se encuentran libres de patógenos, son liberadas, pudiendo ser distribuido el material a los campos de cultivo de propagación comercial (Navarro *et al.*, 1984).

Cuando en un país o región citrícola se ha detectado la presencia de aislados de CTV, con niveles bajos de infección (inferiores al 1%), es posible tomar medidas de erradicación, es decir, prospectar y eliminar árboles CTV positivos, con el propósito de retardar la aparición de la enfermedad o disminuir su inóculo.

En Israel, la primera dispersión natural de CTV fue observada en 1970, estableciéndose un programa de erradicación de árboles infectados. Entre 1970-77, se realizaron más de 300.000 pruebas biológicas mediante el empleo de lima mejicana y el uso de microscopía electrónica. Como resultados de este programa la incidencia de CTV fue efectivamente reducida en la principal zona de erradicación (Bar-Joseph *et al.*, 1989). La estrategia de erradicar esta enfermedad en Israel no fue del todo exitosa, con un costo de 5 millones de dólares y un total de 6 millones de pruebas, pero indudablemente permitió alargar el uso del naranjo amargo por 5 a 10 años (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Este programa fue interrumpido en 1986, continuando sólo en áreas periféricas. En la actualidad la mayoría de las plantaciones están sobre patrones tolerantes (Cambra y Gorris, 2003).

En California, EEUU, se realizaron esfuerzos para erradicar árboles infectados con tristeza. Con este propósito fue creada en 1963, la Agencia para la Erradicación de la Tristeza en California Central ("Central California Tristeza Eradication Agency"). En una primera etapa existió sólo una erradicación importante de árboles en el condado de Kern en 1981, y luego un período con una eliminación mínima de árboles, hasta que se detectó un importante rebrote en 1990 en el condado de Tulare. El alto costo de inspeccionar un total de 73.600 ha (182.000 acres), más el hecho de no observar síntomas de la enfermedad, ya que un 80% de las fincas están sobre patrón tolerante (Hall, 1994), provocaron una gran oposición por parte de los agricultores a estas medidas. Sin embargo según el Dr. A. J. Dodds citado por Hall (1994), un aspecto importante a considerar es la posibilidad que el virus mute a variantes más agresivas, y por lo tanto, se justifica el esfuerzo de mantener niveles de tristeza inferiores al 1%.

1.7.2 Programas de Saneamiento, Certificación y Mejora sanitaria

Una de las formas más eficaces de impedir la dispersión de enfermedades transmisibles por injerto, es la exclusiva propagación de material certificado, con garantías sanitarias y varietales. En cítricos el primer programa de obtención de material registrado y certificado fue desarrollado en California (EEUU). El programa se inició como una forma de enfrentar el problema de psorosis (Calavan *et al.*, 1978), siendo posteriormente reforzado y estimulado por la aparición de brotes epidémicos de tristeza en 1939. Debido al alto número de enfermedades que limitan o afectan severamente a los cítricos, Roistacher (1993), recomienda la obligatoriedad de los programas de certificación como se ha efectuado en España.

La aparición de la enfermedad de la tristeza en 1957 fue la causa de un cambio histórico en la citricultura española, debido a que las plantas injertadas sobre naranjo amargo, son muy susceptibles a la enfermedad. En 1962 y 1968, la enfermedad causó graves daños en las plantaciones y la amenaza de un grave desastre socioeconómico se hizo evidente. Por lo tanto, a partir de 1968 se adoptaron diversas medidas legales relacionadas con la producción de plántones de cítricos para paliar en lo posible esta situación. Se establecieron medidas de: cuarentena y/o control de la introducción de nuevas variedades y patrones, y puesta en marcha de programas de obtención de plantas certificadas libres de virus e injertadas sobre patrones tolerantes a la enfermedad y se prohibió el uso (Cambra *et al.*, 2000a; Cambra y Gorris, 2003; Navarro *et al.*, 2003).

Sin lugar a dudas, que uno de los trabajos que permitió un gran avance en la sanidad de las plantas de cítricos, fue el desarrollo de la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*, la que permite obtener plantas sin caracteres juveniles y libre de todos los patógenos que afectan a los cítricos (Navarro *et al.*, 1975). La disponibilidad de esta técnica permitió iniciar en España en 1975 el Programa de Mejora Sanitaria de Variedades de Cítricos, que de hecho es la combinación de tres programas coordinados: Cuarentena, Saneamiento y Certificación.

El programa de Saneamiento tiene como objetivo recuperar plantas sanas de cultivares locales o no locales de interés. Para ello se seleccionan plantas madres, las que se analizan para la detección de patógenos. La obtención de plantas libres se puede obtener mediante cultivo *in vitro* de nucelas, de óvulos y el microinjerto de ápices caulinares (Navarro *et al.*, 1975; Navarro y Juárez, 1977; Navarro *et al.*, 1979), siendo este

último método el más empleado en todos los programas de saneamiento a nivel mundial.

La legislación asociada al programa de Certificación tiene por objetivo garantizar el estado sanitario y la autenticidad varietal, y que éste se mantenga durante el proceso de propagación en los viveros. Así también, se controla la calidad agronómica de las plantas. Este programa consiste en la regulación legal de las diferentes etapas de la producción de plantas en los viveros y de los requisitos periódicos de pruebas de diagnóstico de patógenos y de la inspección visual de los diferentes bloques de árboles utilizados (Navarro, 2000).

Estos programas en su conjunto permiten producir plantas de vivero sanas, constituyéndose esta tecnología en una importante herramienta para el control de enfermedades transmisibles por injerto. El programa de Mejora Sanitaria ha producido un aumento de la producción estimada entre un 10 y 25%, junto con un incremento en la calidad de los frutos (Navarro *et al.*, 2003). Actualmente cerca del 95% de las plantaciones españolas (más de 300.000 ha) proceden del programa (M. Cambra, comunicación personal, 2007).

1.7.3 Protección cruzada

La primera evidencia de protección cruzada natural de lima mejicana fue reportada en Brazil (Giacometti y Costa, 1958). Posteriormente, Muller y Costa (1968) informaron acerca de una experiencia de protección cruzada exitosa en naranja Pera en Brasil. Esta protección se basa en la selección previa de aislados de CTV "protectores", capaces de impedir la instauración de aislados más agresivos, una vez inoculados en el cultivar a proteger. Este método también denominado de pre-inmunización, ha supuesto un importante hito en la industria brasileña puesto que el 100% de plantas se comercializan pre-inmunizadas. Posteriormente Broadbent *et al.* (1991), en trabajo efectuado en Australia, demuestran la capacidad productiva de árboles inoculados con aislados suaves (provenientes de árboles asintomáticos presentes en el campo y capaces de producir sólo síntomas leves en plantas de lima mejicana) de CTV por espacio de 20 años, en comparación con árboles no inoculados los que presentaban daños severos por acanaladuras en la madera y menor tamaño de los frutos.

Reportes sobre resultados obtenidos mediante esta técnica en Sudáfrica, en donde aislados agresivos de tristeza causantes de acanaladuras se encuentran ampliamente distribuidos al igual que aislados tipo DI en Florida, EEUU, se ha constituido en la única herramienta para contrarrestar los daños causados por la enfermedad (Lee *et al.*, 1987; Van Vuuren *et al.*, 1993; Powell *et al.*, 1999; Powell *et al.*, 2003a y b).

Aislados atenuados de CTV han sido seleccionadas debido a que disminuyen el daño causado por razas severas de CTV. Sin embargo, no existen aislados suaves en Florida (EEUU) que protejan por un largo período de tiempo contra el daño causado por ciertos aislados de CTV que producen acanaladuras. Por otro lado, el conocimiento de la diversidad genética de los aislados de CTV, puede complicar la identificación de razas que protejan la efectividad de la protección cruzada (Roberts *et al.*, 2001).

Hasta hace pocos años el mecanismo de protección cruzada dentro de una planta no era conocido, aunque el fenómeno mismo se conoce desde hace décadas (Bar-Joseph *et al.*, 1989). Hoy en día este mecanismo se conoce como interferencia mediada por RNA, específicamente asociado al silenciamiento post-transcripcional (PTGS), y que puede ser desencadenado por transcritos con estructuras de dsRNA o que expresan altos niveles o niveles aberrantes de transcritos, producidos en el proceso de replicación de un virus. Una vez desencadenado este proceso, los intermediarios que contiene dsRNA son reconocidos por una nucleasa, denominada "Dicer", que los divide en fragmentos pequeños denominados siRNAs (RNA de silenciamiento) de ambas polaridades y de 21 a 25 nt de longitud. Estos siRNAs actúan como guías para dirigir la maquinaria de degradación del RNA contra todo RNA con homología a la secuencia desencadenante (del Vas *et al.*, 2004).

1.7.4 Resistencia Genética

Ya que la tristeza, en muchos casos, es una enfermedad de combinación portainjerto/variedad, lo ideal sería obtener combinaciones resistentes utilizando genes de resistencia distintos, para procurar la máxima durabilidad. Se ha detectado resistencia a CTV en cuatro especies: *P. trifoliata*, *Fortunella crassifolia* Swing., *C. grandis* (L.) Osbeck y *Citrus aurantium*, las que son sexualmente compatibles con las especies cultivadas del género *Citrus*, por lo que se está estudiando el número mínimo de genes involucrados, su modo de acción y donde están localizados en el mapa genético. Esta información

permitirá diseñar los cruzamientos y esquemas de selección más eficaces dentro de los programas de mejora de cítricos actualmente en desarrollo (Bernet *et al.*, 2004).

Otro aspecto que se está abordando en diferentes países es el programa de mejora genética de patrones mediante hibridaciones dirigidas. En España, se está buscando patrones tolerantes a CTV, con tolerancia además a suelos calizos, salinidad, *Phytophthora* spp., y nemátodos. De un estudio de 508 híbridos, cuatro de éstos han sido entregados a los viveros españoles de cítricos autorizados. El híbrido Forner-Alcaide (F&A 5), resistente a CTV, cuenta con la protección comercial de la Unión Europea y ya se ha comenzado su propagación comercial (Forner y Alcaide, 1993, 1994; Forner y Forner, 2003).

Las primeras plantas transgénicas con resistencia a virus se obtuvieron en 1986 mediante la expresión del gen que codifica para la cubierta proteica del virus, fueron obtenidas por Powell-Abel *et al.* (1986), al lograr resistencia al virus del mosaico del tabaco en plantas transgénicas de la misma especie, y ha sido aplicado con éxito en más de 20 virus diferentes (Domínguez *et al.*, 2000). Diversas especies de cítricos han sido transformadas, ya sea mediante un gen de la cubierta (CTV-CP), el gen de la replicasa (RdRp), el gen que codifica a la proteína p20 (de función desconocida), la secuencia de p23 + 3'UTR (p23U), entre otros (Gutiérrez *et al.*, 1997; Domínguez *et al.*, 2000; Ghorbel *et al.*, 2000; Febres *et al.*, 2003; Batuman *et al.*, 2006; Fagoaga *et al.*, 2006).

En España se han producido más de 40 líneas transgénicas de lima mejicana que expresan el gen p25 de un aislado suave y de un aislado agresivo de CTV. Las plantas transgénicas fueron desafiadas con aislados homólogos y heterólogos al expresado. Se ha demostrado que algunas plantas fueron parcial o totalmente protegidas contra CTV (Domínguez *et al.*, 2002). También se han producido plantas transgénicas de lima mejicana que expresan genes de anticuerpos específicos de la cápside en formato de cadena simple de anticuerpos (scFv, "single chain" Fv). Los anticuerpos recombinantes introducidos (scFv3FD1 y scFv3CA5) pueden ser capaces de interferir con la infección viral, no presentando riesgo inherente al uso de parte del genoma viral (Terrada *et al.*, 2000).

2. Objetivos

2.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el conocimiento de la situación global del virus de la tristeza de los cítricos y de la enfermedad que produce en Chile, considerando aspectos de incidencia, epidemiología, distribución espacio-temporal de su agente causal, así como la caracterización biológica, serológica y molecular de aislados representativos. Todo ello, con la intención de prevenir daños y de dictar recomendaciones para evitar la dispersión de la enfermedad.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar mediante un muestreo minucioso de los árboles presentes en huertos comerciales de cítricos, la incidencia real de CTV en Chile, tanto a nivel regional como nacional.
2. Realizar una caracterización completa (biológica, serológica y molecular) de aislados de CTV procedentes de diferentes hospedadores con o sin síntomas, y de diferentes zonas geográficas y ecológicas de Chile.
3. Analizar la eficacia de transmisión de aislados chilenos de CTV en condiciones de campo y estudiar la distribución espacial y temporal de este virus en parcelas de diversas zonas ecológicas chilenas. Así como, determinar las especies de pulgones vectoras de CTV presentes en Chile.
4. Emitir recomendaciones prácticas para reducir el impacto de CTV en Chile y prevenir la dispersión de aislados agresivos.

3. Parte Experimental

3. 1. ESTIMA DE LA INCIDENCIA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN CHILE

3.1.1 Introducción

El virus de la tristeza de los cítricos probablemente está presente en todos los países citrícolas, aunque su incidencia es muy variable. Es prácticamente endémico en la mayor parte de Asia, sur de África, Australia y Sudamérica, y tiene elevada incidencia en las principales zonas citrícolas de Estados Unidos de América (EEUU), Israel y España, y se ha dispersado por diversos países de América Central y el Caribe. Por otro lado, se ha detectado en árboles aislados y aún no tiene carácter epidémico en muchos países del Mediterráneo y Próximo Oriente como: Albania, Argelia, Chipre, Egipto, Francia, Grecia, Jordania, Líbano, Libia, Marruecos, Palestina, Portugal, Siria, Túnez y Turquía, aunque sí en Italia y en algunos países de América Central y del sur como Belice, Chile, Ecuador, El Salvador, Honduras, Méjico o Nicaragua (Cambra y Moreno, 2000).

Se han realizado evaluaciones de la incidencia de CTV en diferentes países, como por ejemplo en: Israel (Bar-Joseph *et al.*, 1978), basado tanto en el análisis de frutos en plantas embaladoras como en árboles de campo, en la Comunidad Valenciana, España (Cambra *et al.*, 2000c), el Estado de Nuevo León, Méjico (Silva-Vara *et al.*, 2001), en California (EE.UU.) (Gottwald *et al.*, 2002) y en Cuba (Peña *et al.*, 2002).

En Chile, la importancia de la industria citrícola ha ido en aumento, orientándose hacia la exportación de fruta fresca, especialmente de limones y mandarinos, aunque con un creciente interés en naranjo dulce. Existen actualmente un total de 7.663 ha plantadas con limoneros, 7.294 ha con naranjo dulce y 1. 245 ha con mandarinos. Hasta el inicio de este estudio, no habían sido observados síntomas asociados a tristeza (Weathers y Sánchez, 1970, Besoain *et al.*, 2000). A fines de la década de 1960, surgieron antecedentes referentes que CTV estaba presente en limoneros Meyer (*Citrus limon* L) en todo el país, como también se detectó la presencia de especies de pulgones potenciales vectores del virus. En total se encontraron cerca de 2000 limoneros Meyer, todos ellos infectados por el virus (Weathers *et al.*, 1969; Sánchez y Weathers, 1970), los que fueron posteriormente erradicados.

Esta situación fue confirmada por una prospección efectuada en el país entre los años 1967 a 1970, por medio de un convenio de cooperación entre la Universidad de Chile y la Universidad de California (EE.UU.). Los resultados señalaron la presencia de CTV en

árboles aislados de colecciones de variedades, en las principales zonas cítricas del país (Sánchez, 1996). El diagnóstico de CTV fue realizado mediante el uso de la planta indicadora lima mejicana, en pruebas efectuadas bajo condiciones de invernadero libres de insectos. Es así como en una primera etapa, CTV se detectó sólo en árboles de colección y en todos los limoneros cv. Meyer que se estudiaron. Una segunda etapa se orientó a conocer la posible forma de transmisión del virus a nivel de campo en los árboles cercanos a los positivos (Sánchez, 1996; Weathers *et al.*, 1969). Estos autores observaron varios árboles adultos de naranjo dulce injertados sobre naranjo agrio que presentaban decaimiento, con síntomas muy similares a los producidos por tristeza, sin embargo, en ninguno de los casos, fue identificado CTV, concluyendo que el decaimiento se debía a otras causas.

En trabajos posteriores realizados por Besoain *et al.* (2000), se detectó mediante serología y pruebas biológicas, la presencia de CTV en árboles de lima mejicana, limonero, naranjo dulce, tangelos y pomelos, en huertos ubicados desde la I Región hasta la VI Región (véase Figura 3.1). Sin embargo, en estos estudios tampoco fue posible observar a nivel de campo, síntomas de decaimiento (DI) en plantas de naranjo dulce injertadas sobre naranjo agrio, ni acanaladuras de la madera (SP) en variedades de pomelo.

Chile, además de poseer históricamente un buen sistema de cuarentena organizado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) del Ministerio de Agricultura, posee excelentes barreras naturales para impedir el ingreso de vectores o plagas que afectan a los cítricos. Sin embargo, esta situación no resulta del todo clara en todo el país, ya que zonas limítrofes de la I Región (véase mapa Figura 3.1), no poseen una barrera natural eficiente, pudiéndose desplazar *T. citricida* (o haberse desplazado) desde Perú, en donde se encuentra presente (Roistacher, 1988). Por otro lado, está la situación del Oasis de Pica (I Región), en donde en el año 1997, se detectó la presencia de CTV en diversas especies de cítricos, sin observarse la clásica sintomatología de tristeza ni acanaladuras de la madera, sólo la presencia de aclaramiento de venas en árboles de lima mejicana comúnmente denominado en Chile limón de Pica (*Citrus aurantifolia* L) (Besoain *et al.*, 2000).

Considerando todos estos antecedentes, y para evaluar de forma concluyente la situación real de las zonas cítricas chilenas respecto a CTV, se ha creído oportuno realizar una amplia prospección para determinar la incidencia real de CTV y estudiar la situación actual de sus posibles vectores.

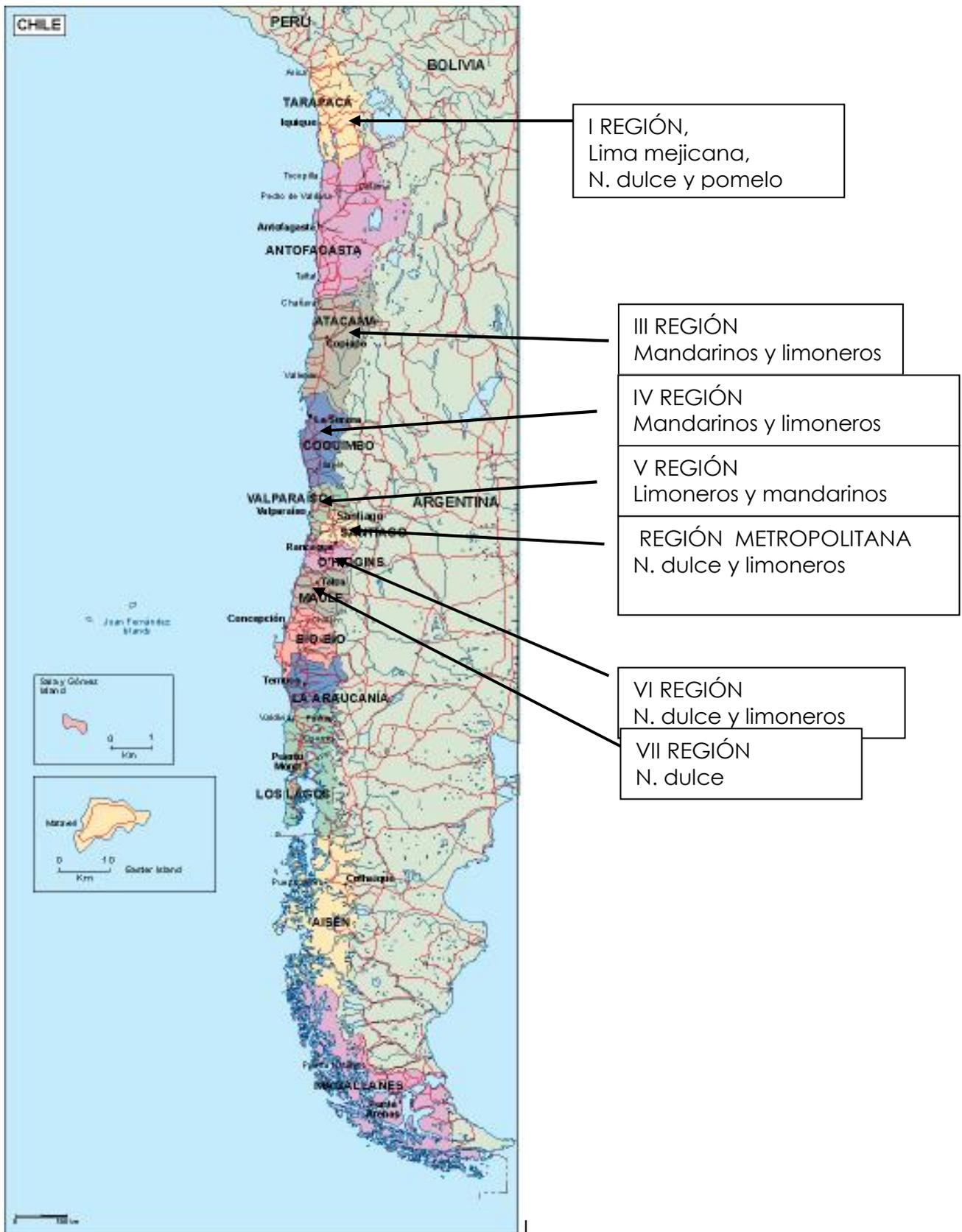


FIGURA 3.1. Regiones cítricas de Chile. En el esquema se indican las siete regiones muestreadas, y las principales especies de cítricos presentes en cada región.

3.1.2 Materiales y métodos

3.1.2.1 Prospección nacional

La prospección de CTV en Chile se realizó entre los años 1999-2002. Se muestrearon los principales huertos comerciales (considerando huertos con superficie igual o superior a 0,5 ha) localizados en las regiones: I, III, IV, V, VI, VII y Metropolitana (Figura 3.1). El muestreo consistió en analizar al azar al menos el 1% de los árboles presentes en cada huerto. Un equipo de dos personas se desplazó por las zonas citrícolas, seleccionando el primer árbol mediante un sistema de muestreo con arranque aleatorio, y así los siguientes cada 100 árboles. Dos brotes jóvenes por árbol fueron recolectados durante los meses de otoño y primavera. En el caso de zonas más calurosas ubicadas en la I y III región, el muestreo se realizó durante el invierno. El material recolectado fue depositado en contenedores con hielo, y luego almacenados en laboratorio a temperaturas entre 4-6°C por un máximo de 5 días antes del análisis. Los análisis se realizaron inicialmente por ELISA-DAS sistema biotina/estreptavidina (Ingenasa) (Cambra *et al.*, 1991b). El kit empleado se basa en el uso de la combinación de anticuerpos monoclonales 3DF1 y 3CA5 (Vela *et al.*, 1986) y fue utilizado entre los años 1999 y 2001 para la detección de CTV. Durante el año 2002, se empleó la técnica de inmunopresión-ELISA (IIP-ELISA) (Garnsey *et al.*, 1993; Cambra *et al.*, 2000b) utilizando un kit comercial (Plant Print Diagnostics) basado en el empleo de la misma combinación de anticuerpos de acuerdo a Cambra *et al.* (2000b) y EPPO (2004). Las improntas se realizaron en laboratorio tras la recolección de las muestras.

3.1.2.2 Incidencia estimada versus real

Con el propósito de correlacionar la incidencia estimada en la prospección nacional con la incidencia real presente en predios CTV positivos, se seleccionaron un total de 20 predios en distintas zonas ecológicas que fueron analizados entre uno a cuatro años después del primer muestreo. En cada uno de estos predios, se analizaron en forma individual un total de cien árboles, utilizando un total de cuatro brotes por árbol, obtenidos alrededor de la copa. Las muestras fueron analizadas mediante IIP-ELISA.

3.1.2.3 Monitoreo de especies de pulgones

Durante la prospección nacional realizada, se procedió a buscar, recolectar e identificar colonias de pulgones establecidas en brotes de árboles muestreados y/o árboles vecinos. Los pulgones fueron conservados en frascos conteniendo alcohol etílico (70%) y posteriormente fueron fijados y montados en portaobjetos e identificados con la ayuda de un microscopio óptico.

Adicionalmente, desde el año 2002 al 2005, se estimaron las especies de pulgones que visitaron árboles adultos mediante el método del brote pegajoso (Avinent *et al.*, 1993; Marroquín *et al.*, 2004). Con este propósito, se seleccionaron tres predios, localizados en las regiones IV, V y Metropolitana. Los resultados de esta prospección se muestran en el apartado 3.5.2.2, para comprender la dispersión espacio-temporal de CTV observada.

3.1.3 Resultados y discusión

3.1.3.1 Prospección nacional de CTV

Los resultados obtenidos confirman la presencia de CTV en Chile. La incidencia media estimada entre los años 1999-2002 fue de un 0,38% (90.267 árboles analizados). De los árboles analizados al azar, la mayor proporción correspondió a limoneros (39,4%), seguido de naranjo dulce (35,1%) y mandarinos (21,4%). Esta distribución de árboles analizados al azar, corresponde con la importancia del cultivo (superficie cultivada con cada especie), validando, indirectamente, la calidad del muestreo realizado aleatoriamente.

La incidencia de CTV por especies hospederas se presenta en el Cuadro 3.1, y la distribución de plantas infectadas por regiones y especies hospederas se presenta en el Cuadro 3.2. De ello se deduce que CTV se encuentra asociado principalmente a árboles de naranjo dulce (37,2% de los árboles positivos encontrados), lima mejicana (26,8%) y limoneros (17,3%).

La relativamente alta incidencia de CTV en limoneros se justificaría por el uso de material vegetal propagativo infectado, ya que como es conocido, CTV prácticamente no se transmite mediante pulgones entre limoneros o desde esta especie hacia otras (Cambra *et al.*, 2000a). La incidencia en naranjo dulce y lima mejicana podría ser debida a una combinación de transmisión por injerto y dispersión por vectores. La ocurrencia de transmisión principalmente por injerto en naranjo dulce y limonero, en etapas previas al período en que transcurrió esta prospección (1999-2002), se contrapone con el caso de los mandarinos o clementinos. En ellos, se observó una muy baja incidencia (Cuadro 3.2), probablemente debido a que los principales huertos del país fueron plantados en los últimos años con material libre de virus procedente de España.

Durante esta prospección no se observaron síntomas de decaimiento de árboles de naranjos, mandarinos o pomelos injertados sobre naranjo amargo, infectados por CTV. Este aspecto coincide con lo observado previamente (Weathers y Sánchez, 1970; Besoain *et al.*, 2000), si bien, la gran mayoría de los huertos están injertados en portainjetos trifoliados (citranges Troyer y Carrizo), aún persisten huertos antiguos injertados sobre naranjo amargo, especialmente en las regiones Metropolitana y VI. Sin embargo, se observaron claros síntomas de acucharamiento de hojas y aclaramiento de venas, y en algunos casos, acanaladuras en la madera ("stem pitting"), en los árboles de lima

mejicana CTV positivos presentes en los oasis de Pica y Matilla, I Región. Durante el año 2002, en visita a parcelas experimentales ubicadas en el oasis de Pica, se observaron síntomas de acanaladuras de la madera en árboles de pomelo cv. Marsh injertados sobre citrange Troyer y del cv. Star Ruby injertado sobre *C. macrophylla*. Los síntomas observados fueron: una apariencia acordonada del tronco y ramas principales, fruta de menor tamaño y acanaladuras longitudinales presentes en la madera de troncos y ramas, las que se complementaban con engrosamientos presentes en la corteza (Figuras 3.2A y 3.2B). Este último síntoma también se observó en el portainjerto *C. macrophylla* (Figura 3.2C). CTV fue consistentemente detectado mediante inmunoimpresión-ELISA en todos los árboles afectados, que además indujeron acanaladuras en la madera en pomelo cv. Duncan (Figura 3.2.D) y una reacción de "seedling yellows" en naranjo amargo y pomelo (Figura 3.3C). Este tipo de síntomas fueron previamente descritos en pomelos por Drake y Wallace (1951) y Wallace (1978). En ninguno de los árboles de pomelo se observó la presencia de goma, ni síntomas de patrón de hoja de roble, propio de árboles con síntomas de concavidades gomosas (Roistacher, 1991), hecho que se confirmó posteriormente en las pruebas biológicas con plantas indicadoras.

Según los resultados de esta prospección, la incidencia más alta de CTV se encontró en la I Región (Cuadros 3.2 y 3.3), especialmente debido a la incidencia de este virus en los oasis de Pica y Matilla. Por otro lado, en el Valle de Azapa, localidad que está muy cerca del borde con Perú, sólo siete muestras resultaron positivas, con una incidencia de un 3,1%. Aparentemente, no debió de ocurrir diseminación natural de CTV mediante pulgones entre Chile y Perú. Esto se refuerza por el hecho de no haberse detectado la especie *Toxoptera citricida* en esta prospección.

La situación de la tristeza en la I Región de Chile es distinta a la de la zona central, debido posiblemente al hecho que en esta zona los predios son pequeños (la mayoría inferiores a 0,5 ha) y el virus se ha logrado dispersar desde huertos con CTV hacia el resto debido a su proximidad. Este aspecto fue abordado por Bar-Joseph *et al.* (1989), quienes estimaron que la dispersión natural por pulgones, en dos años, fue en torno a 79 m, aunque en España se ha determinado que esta distancia es menor (Gottwald *et al.*, 1996). Las localidades que presentan la mayor incidencia corresponden a los oasis de Pica y Matilla, conformada por un área regada de aproximadamente 300 ha, que incluye diversos cultivos como cítricos, mangos, guayabas, entre otros, y que se encuentra separada de la zona central por el desierto de Atacama. La incidencia media de CTV en estas dos comunas resultó del 17,2% (datos no mostrados), las que contribuyeron a

aumentar el promedio de la región a 15,3% (Cuadro 3.3). Las principales especies de cítricos cultivadas corresponden a árboles de lima mejicana (localmente denominados "limón de Pica") y a naranjos dulces.

La incidencia de CTV en la I Región resultó del 15,3 %, sin embargo, la incidencia media en el resto de las regiones cítrícolas de Chile resultó únicamente en 0,12% (106 árboles positivos de un total de 87.979 árboles muestreados) (Cuadro 3.2 y 3.3).

CTV no se encuentra ampliamente distribuido en regiones de la zona central de Chile, comprendida entre las regiones III y VII (Figura 3.1), donde se encuentran los principales huertos comerciales. Sin embargo, esta situación puede variar en los próximos años, como ha ocurrido en otras zonas (Roistacher y Gumpf, 1986; Bar-Joseph *et al.*, 1989). En California (EE.UU.) e Israel, ocurrió un período de latencia de 30 a 50 años entre la introducción de árboles infectados con CTV y la dispersión natural de razas severas de tristeza mediante *A. gossypii* (Rocha-Peña *et al.*, 1995). Bar-Joseph (1978) especuló con una protección cruzada natural que hipotéticamente ejercerían, durante este período de latencia, aislados atenuados de CTV. Aislados no transmisibles ejercerían un efecto sobre aislados más eficientemente transmitidos por *A. gossypii*, y sugiere que esta protección se quiebra al cabo de 30 años, resultando en un aumento de la incidencia de razas severas de CTV. Hoy en día se sabe que la protección cruzada se explica por fenómenos de silenciamiento génico (Del Vas *et al.*, 2004).

Uno de los aspectos que pudo haber contribuido a producir o incrementar la incidencia de CTV en los oasis de Pica y Matilla, es que durante los años 1990 a 1995 ocurrió una campaña de erradicación de mosca de la fruta en esa zona llevada a cabo por el SAG (IICA, 1996). Por este motivo, se empleó una alta cantidad de insecticidas, lo que se tradujo en un fuerte incremento posterior de plagas como mosquitas blancas y pulgones, al ser eliminados sus enemigos naturales. De hecho a pesar de los esfuerzos realizados por el SAG por reintroducir enemigos naturales de mosquita blanca, aún este problema está fuertemente arraigado en estos dos oasis (Figura 3.4B).

En España e Israel, se estima que existió un período de unos 25-30 años entre la introducción de plantas infectadas con CTV y el primer brote epidémico de tristeza (Cambra *et al.*, 2000a). Si consideramos que en Chile la primera vez que se detectó CTV fue a fines de la década de 1960 (Weathers *et al.*, 1969), este período de latencia puede estar llegando a su fin. Es muy posible que en un futuro próximo algunos síntomas de

decaimientos por tristeza puedan ser observados, especialmente asociados a antiguos huertos de naranjo dulce injertados sobre patrón amargo, especialmente ubicados en la VI Región de Chile.

3.1.3.2 Incidencia estimada versus real

En el Cuadro 3.4 se compara la incidencia estimada durante la prospección (1999-2000) con la basada en el análisis de 100 árboles en el foco detectado, denominada en esta tesis como "real". Estimaciones realizadas durante la prospección nacional, calculadas en base a una fracción de muestreo del 1% de los árboles, resultó en general concordante con la incidencia real u observada.

En los predios donde no existió correlación fue básicamente en huertos pequeños, como por ejemplo, en la I Región (PI-2, PI-3), en donde la incidencia estimada fue de 0% versus la real que resultó de un 67,1 y 69,3%, respectivamente (Cuadro 3.4). En el caso de España, se ha recomendado el análisis de, al menos, el 10% de los árboles para estimar la incidencia de CTV en huertos pequeños (Cambra *et al.*, 2000c). Sin embargo, también es importante considerar que en la I Región, la incidencia real fue calculada cuatro años después de la prospección inicial, de modo que pudo haber existido dispersión CTV, sobre todo considerando la proximidad de estos huertos a otros con alta incidencia de la enfermedad.

3.1.3.3 Monitoreo de especies de pulgones

Se detectaron las siguientes especies de pulgones descritas como vectoras de CTV: *A. gossypii*, *A. spiraecola* y *T. aurantii*, en prácticamente todas las regiones cítricas de Chile, a excepción de la VII Región. La especie *T. citricida* no fue detectada en ninguna de las localidades prospectadas, ni observada en años posteriores a esta prospección hasta 2007.

Datos complementarios a estas observaciones se muestran en el apartado 3.5.2.2 de epidemiología, basados en prospecciones realizadas con la técnica del brote pegajoso, que estima las especies de pulgones que visitan los árboles (Marroquín *et al.*, 2004).



FIGURA 3.2. A. Síntomas de acordonamiento de árbol de pomelo cv. Marsh injertado sobre *C. macrophylla*, en donde se observa deformación de tronco y ramas principales. B. Árbol de pomelo cv. Star Ruby injertado sobre *C. macrophylla*, en donde se aprecian acanaladuras en la madera y sobrecrecimiento de la corteza. C. Acanaladuras presentes en portainjerto *C. macrophylla*. Fotos A, B y C fueron tomadas en oasis de Pica. D. Planta indicadora de pomelo cv. Duncan inoculada con aislado capaz de inducir síntomas de acanaladuras en la madera. E. Acanaladura presente en portainjerto *C. macrophylla* injertado con limonero, localidad de Ovalle.

CUADRO 3.1. Incidencia del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) por especie hospederas en Chile.

Cítrico Hospedero	Árboles muestreados (N°)	Superficie muestreada (ha)	Muestras CTV positivas	Incidencia de CTV (%)
Naranja	31.644	6.699,1	129	0,41
Limonero	35.589	5.043,7	60	0,17
Mandarino	19.315	1.344,7	5	0,03
Pomelo	2.369	310,7	23	0,97
Lima mejicana	949	99,0	93	9,80
Tangelo	308	44,6	35	11,36
Lima Bears	93	108,0	2	2,15
Total	90.267	13.551,0	347	0,38

CUADRO 3.2. Distribución de muestras CTV positivas por regiones y especie hospedadora.

Cítrico hospedero	Regiones de Chile							Total
	I	III	IV	V	RM*	VI	VII	
Naranja	85	2	0	1	7	34	0	129
Limonero	2	0	1	0	25	32	0	60
Mandarino	2	1	0	0	0	2	0	5
Pomelo	23	0	0	0	0	0	0	23
Lima mejicana	93	0	0	0	0	0	0	93
Tangelo	35	0	0	0	0	0	0	35
Lima Bears	1	0	0	1	0	0	0	2
Total	241	3	1	2	32	68	0	347

RM= Región Metropolitana

CUADRO 3.3. Detección de CTV en diferentes regiones de Chile entre los años 1999-2002.
Detalle del número de fincas prospectadas, superficie, número de árboles muestreados por región e incidencia.

Región	Fincas (Nº)	Superficie (ha)	Árboles (Nº)	Árboles muestreados (Nº)	Incidencia de CTV (%)
I	55	277,0	49.016	2.288	15,30
III	20	305,0	105.387	1.128	0,20
IV	44	1.540,1	667.835	27.475	0,004
V	208	2.003,2	984.759	23.223	0,003
Metropolitana	614	4.721,9	1.701.654	17.481	0,18
VI	364	4.616,1	1.779.926	18.324	0,32
VII	18	87,0	39.102	348	0,00
Total	1.323	13.551,0	5.318.080	90.267	0,38

CUADRO 3.4. Incidencia estimada del virus de la tristeza de los cítricos (%) en 20 fincas diferentes localizadas en seis regiones de Chile, en contraste con la incidencia real calculada 1-4 años después.

Región de Chile	Código de Finca	Árboles (Nº)	Árboles analizados (Nº)	Incidencia de CTV estimada* (%)	Incidencia real de CTV** (%)
I	PI-Pr1	700	8	21,7	83,2
I	PI-Pr2	1.100	11	100,0	100,0
I	PI-Pr3	2.200	22	20,2	82,8
I	PI-2	1.500	15	0,0	67,1
I	PI-3	600	6	0,0	69,3
I	Ma-16	168	2	0,0	0,0
I	Var-3	150	2	100,0	16,3
III	Ova-8	14.976	150	0,01	4,1
IV	Lim-2	1.917	20	2,5	3,0
V	Mel-108a	1.667	18	11,4	1,0
RM***	Mel-111	1.525	16	1,0	1,0
RM	Mel-112	1.136	124	2,1	0,0
RM	Ber-2	1.200	14	7,1	4,2
RM	Pai-46	2.048	22	3,8	5,0
RM	Tal-1	4.250	44	1,8	1,1
RM	Pef-1	3.392	35	0,8	0,0
RM	Peu-7	2.816	290	0,4	0,0
VI	Peu-13a	234.600	2.463	0,3	1,0
VI	Peu-13b	16.307	165	0,3	1,0
VI	Pich-1	21.624	219	13,2	0,0

* La incidencia estimada de CTV (%), fue obtenida mediante el muestreo al azar de al menos un 1% de los árboles.

** La incidencia real de CTV fue calculada en un cuadrante de 10 x 10 árboles, aunque en algunos casos el cuadrante seleccionado contó con fallos. Todos los árboles fueron analizados mediante IIP-ELISA para detección de CTV.

*** RM= Región Metropolitana

3.2 CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS CHILENOS DE CTV

3.2.1 Introducción

El virus de la tristeza de los cítricos ha sido detectado tradicionalmente mediante el uso de la especie lima mejicana. Los primeros investigadores que demostraron que la tristeza era transmisible por injerto a plantas de lima fueron Hughes y Lister (1949). Estos autores encontraron que el aclaramiento de venas era un síntoma de la enfermedad, que describieron como muerte regresiva de plantas de lima en Ghana (Costa de Oro) de África. Posteriormente, Wallace y Drake (1951), emplearon la lima mejicana como planta indicadora de CTV.

En 1987, un grupo de investigadores propusieron una caracterización biológica estandarizada ("Standardized host-range test", *SHR*) de CTV, con el propósito de determinar la agresividad de los mismos en diferentes hospederos. Esta clasificación se basó en la utilización de cinco plantas diferentes o combinaciones de cítricos, que en su conjunto permiten evaluar el tipo de aislado presente en un árbol y su agresividad (Garnsey *et al.*, 1987). Las cinco plantas propuestas fueron: lima mejicana, naranjo dulce cv. Madame Vinous, naranjo amargo, pomelo cv. Duncan, y la combinación de naranjo dulce injertado sobre naranjo amargo.

Con el propósito de estudiar los tipos de aislados chilenos de CTV y sus características patogénicas, se llevó a cabo una amplia caracterización, mediante el empleo de 5 hospederos diferenciales, de 100 aislados de CTV procedentes de diferentes orígenes (región citrícola, localidad, hospederos y presencia o no de síntomas).

3.2.2 Materiales y métodos

Se constituyó una colección de aislados chilenos de CTV, procedentes de diferentes localidades geográficas y de distintos hospederos (Cuadro 3.5), que fueron recolectados durante una prospección nacional efectuada entre 1999 a 2002 (Capítulo 3.1). Un criterio adicional para la selección de aislados fue la presencia o no de síntomas. Se seleccionaron 100 árboles CTV positivos de los que se tomaron brotes que se analizaron por IPP-ELISA (véase apartado 3.1.2.1) para confirmar la presencia de CTV.

La evaluación de los aislados chilenos de CTV para incluirlos en grupos biológicos, fue realizada mediante el protocolo estándar propuesto por Garnsey *et al.* (1987). Dos trozos de corteza sin yema fueron injertados a modo de inóculo a cuatro plantas de cinco especies de plantas indicadoras, previamente obtenidas de semillas certificadas de: lima mejicana, naranjo amargo, pomelo cv. Duncan y naranjo dulce cv. Madame Vinous. Además, se emplearon plantas de naranjo dulce cv. Madame Vinous injertado sobre naranjo amargo para evaluar decaimiento. Una vez concluida esta prueba, se emplearon las mismas plantas para injertar sobre el naranjo dulce infectado con CTV, yemas de naranjo amargo (Pina *et al.*, 2004).

Las plantas fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero a temperaturas entre 18 y 26°C, sugerida por Roistacher (1991) como temperaturas óptimas para el desarrollo de síntomas de tristeza. Las plantas a caracterizar fueron mantenidas por espacio de un año, procediéndose a evaluar síntomas cada seis meses. La lectura de síntomas se realizó mediante presencia o ausencia de síntomas. En el caso de los pomelos, luego del primer año de ensayo fueron colocados a temperaturas que oscilaban entre 32 y 38°C, sugerido por Broadbent *et al.* (1996) a modo de mejorar el desarrollo del síntoma de acanaladuras de la madera.

Se empleó lima mejicana para evaluar el aclaramiento de venas y acanaladura de la madera de cada uno de los aislados, la combinación naranjo dulce cv. Madame Vinous injertado sobre naranjo amargo fue empleada para evaluar clorosis y colapso de plantas. Esta técnica fue complementada con la metodología propuesta por Pina *et al.* (2004), que proponen el injerto de yemas de naranjo amargo sobre naranjo dulce con infección sistémica del aislado de CTV a evaluar. La pobre brotación a su ausencia y existencia de brotes muertos denotaría la presencia de aislados de CTV tipo DI. Se utilizaron plantas de semilla de naranjo amargo para evaluar la presencia del síndrome

“seedling yellows”, plantas de semilla de pomelo Duncan para evaluar la presencia de acanaladuras de la madera y “seedling yellows” y naranjos dulces de semilla cv. Madame Vinous, para evaluar la presencia de clorosis y acanaladuras en la madera.

3.2.3 Resultados y discusión

La agrupación de aislados propuesta por Rocha-Peña *et al.* (1995), ampliada por Hilf *et al.* (2005), basada en el trabajo efectuado por Garnsey *et al.* (1987), fue modificada al añadir las reacciones de naranjo agrio sobre naranjo dulce de acuerdo a lo propuesto por Pina *et al.* (2004). De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta caracterización biológica (Cuadro 3.5), se desprende que la mayoría de los aislados de CTV recolectados en Chile (55%) presentan características de aislados suaves o moderados, es decir, dan sólo reacción en lima mejicana y/o reacción DI en la combinación naranjo agrio sobre naranjo dulce. Es importante notar que este tipo de reacción sólo se produjo en la prueba biológica propuesta por Pina *et al.* (2004) y no en la convencional de dulce/amargo. Todos los aislados estudiados produjeron síntomas en lima mejicana.

Síntomas de "seedling yellows" (SY) en naranjo agrio se produjo en el 33% de los aislados chilenos (Cuadro 3.5), considerados de acuerdo a Rocha-Peña *et al.* (1995) como aislados agresivos. También se observó una reacción de SY en pomelo (40% de los aislados), sin embargo se desconoce la importancia de este tipo de reacción en la patogenicidad de los aislados. Pero, sin lugar a dudas de acuerdo a diversos autores, los aislados más agresivos son los capaces de causar "stem pitting" en pomelo y/o en naranjo dulce (Roistacher, 1988; Rocha-Peña *et al.*, 1995, Broadbent *et al.*, 1996). Un 17% de los aislados chilenos estudiados fueron capaces de causar este síntoma, 11% en pomelo y un 6% en naranjo dulce (Cuadro 3.5, Figura 3.4A). Finalmente, algunos aislados fueron capaces de causar acorchamiento de venas o "vein corking", en naranjo agrio (Figura 3.3B) o en lima mejicana (Figura 3.3D).

En general, existió coherencia entre la reacción o severidad de síntomas observados en plantas indicadoras y los síntomas observados a nivel de campo. Así los aislados 42-4, 92-2, 507, 509 y 510 (Cuadro 3.5), obtenidos a partir de árboles de pomelo que presentaban síntomas de deformaciones a nivel del tronco y ramas principales, y síntomas de acanaladuras longitudinales en la madera (Figuras 3.2A y 3.2C), también proporcionaron síntomas de este tipo en las plantas indicadoras de pomelo Duncan (Figura 3.2D). En otros casos, se encontró que los aislados obtenidos de un huerto de limonero cv. Eureka injertado sobre *C. macrophylla* de Ovalle (aislados 494, 495 y 497), dieron SP en pomelo. Éstos al momento de la recolección de muestras, eran asintomáticos, pero al cabo de cuatro años era posible observar síntomas de acanaladuras en la madera del

portainjerto (Figura 3.2E). Finalmente, es preocupante la presencia del síntoma de acanaladura de la madera formado en plantas de naranjo dulce cultivadas en invernadero (Figura 3.5A), lo que ocurrió en un 6% de los aislados (Cuadro 3.5), ya que esto denotaría la presencia de aislados agresivos de CTV capaces de causar daño en la variedad de naranjo dulce independiente del portainjerto empleado. Sin embargo, en ninguno de los predios donde estos aislados fueron detectados se observó este tipo de síntomas.

Los aislados más agresivos fueron encontrados en la I Región de Chile, especialmente en las localidades de Pica y Matilla. A esta región pertenecen casi todos los aislados que causaron SP en pomelo o en naranjo dulce. Aislados procedentes de la zona central mostraron, en general, una menor agresividad o capacidad de causar síntomas en las diferentes plantas indicadoras (Cuadro 3.5). Por otro lado, seis aislados recolectados en la zona central presentaron el síntoma de amarillez de plántulas o SY en naranjo agrio, cuatro procedían de un huerto de naranjo dulce sobre citrange Troyer ubicado en la localidad de Limache, V Región (aislados 305-8, 305-5B, 305-6B y 305-12). Los árboles origen de los aislados no muestran ningún síntoma hasta la fecha. Otro aislado fue obtenido de un huerto de naranjo dulce ubicado en la localidad de Peumo (504)(VI Región) y finalmente el sexto procedió del mismo huerto de limonero ubicado en Ovalle (497)(IV Región), que presentó además síntomas de acanaladuras en las plantas indicadoras de pomelo cv. Duncan.

En el Cuadro 3.6 se muestran los grupos biológicos obtenidos mediante la caracterización biológica de los 100 aislados de CTV de Chile. Se pudieron establecer 10 grupos (nótese que se ha denominado a un grupo 5'). Los grupos mayoritarios fueron el 7 (con 33 aislados agrupados) y el 13 (con 20), ambos grupos representan el 53% de los aislados. Éstos se podrían colocar como poco virulentos, ya que únicamente produjeron síntomas en lima mejicana (grupo 13) y además reacción DI naranjo amargo/naranjo dulce (grupo 7). Otro grupo relativamente importante (18% de los aislados estudiados) fue el grupo 4 constituido por aislados de CTV que además de inducir reacción en lima mejicana y de DI amargo/dulce, indujeron reacción de SY en naranjo agrio o amargo. Estos aislados habría que considerarlos potencialmente más agresivos que los anteriormente citados. Además, se pudieron establecer grupos minoritarios entre los que cabe destacar al grupo 10 (5% de los aislados estudiados) que mostraron únicamente síntomas en lima mejicana y reacción SY en naranjo agrio. También merece la pena mencionar que ningún aislado reaccionó con todos los indicadoras, pero el 2% de los

aislados (grupo 2) indujeron reacción en todas los indicadores excepto SP en pomelo cv. Duncan, y por otra parte, también un 2% de los aislados (grupo 3) reaccionó en todos los indicadores salvo en naranjo dulce que no indujo SY. Todos estos últimos grupos indican una posible mezcla de aislados y un potencial más agresivo, manifestado por su sintomatología en campo (Cuadro 3.5).

CUADRO 3.5. Origen y expresión de síntomas de cien aislados chilenos de CTV, después de ser inoculados mediante injerto a cinco diferentes combinaciones de plantas indicadoras según Garnsey *et al.* (1987) más caracterización de su decaimiento según Pina *et al.* (2004).

				P R U E B A S B I O L Ó G I C A S							
Región	Localidad	Hospedador/ síntoma en campo	Aislado	Lima mejicana		ND/NA NA/ND*		Pomelo		N. agrio	N. dulce
				VC	SP	DI	DI	SP	SY	SY	SP
I	Azapa	N. dulce	232-2	Suave	+	-	+	-	-	+	-
I	Azapa	N. dulce	231-1	Severa	+	NE	NE	-	-	+	-
I	Comiña	N. dulce	101-2	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Comiña	N. dulce	101-3	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Comiña	N. dulce	101-4	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Comiña	N. dulce	101-5	Suave	+	-	+	-	-	+	-
I	Comiña	N. dulce	101-6	Severa	+	-	+	-	-	-	-
I	Comiña	N. dulce	301-34	Severa	+	-	+	-	+	-	+
I	Comiña	N. dulce	301-34B	Suave	+	NE	NE	-	-	-	+
I	Matilla	Pomelo	179-1	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-5	Moder.	+	-	+	-	-	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-3	Severa	+	-	+	-	-	+	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-1	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-7	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-21	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-25B	Suave	+	-	-	-	+	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-30B	Suave	+	-	-	-	-	-	-
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-6	Severa	+	-	+	+	+	-	-
I	Matilla	N. dulce	240-1	Suave	+	-	+	-	-	+	-
I	Matilla	N. dulce	244-1	Suave	+	-	+	-	-	+	-
I	Matilla	Tangelo	246-2	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	525	Severa	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	509	Suave	+	-	+	+	+	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	42-4	Moder.	+	-	-	+	+	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	92-2	Moder.	+	-	-	+	-	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	507	Severa	+	-	+	+	+	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	508	Suave	+	-	+	-	-	-	+
I	Pica	Pomelo /SP	510	Moder.	+	-	-	+	+	-	-
I	Pica	Pomelo /SP	511	Severa	+	-	+	-	+	+	-
I	Pica	Pomelo	512	Moder.	+	-	-	-	-	+	-
I	Pica	Pomelo /SP	514	Suave	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	Pomelo /SP	516	Moder.	+	-	-	-	-	+	-
I	Pica	Pomelo /SP	517	Moder.	+	-	-	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	301-2	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	301-6	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	84-1	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	95-3	Moder.	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	95-5	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	95-6	Suave	+	-	-	-	-	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	106-3	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	106-4	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	106-5	Suave	+	-	+	-	-	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	85-1	Suave	+	-	+	-	+	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	301-5	Severa	+	NE	NE	-	+	+	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-9	Severa	+	-	-	-	+	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	301-11	Moder.	+	-	-	-	+	-	-
I	Pica	L. mejicana /VC	327	Moder.	+	-	+	-	+	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	521	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	N. dulce	524	Suave	+	-	+	-	-	+	+
I	Pica	L. mejicana /VC	83-3	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	L. mejicana /VC	301-10	Moder.	+	-	-	-	+	+	-
I	Pica	N. dulce	301-41B	Suave	+	-	+	-	+	+	-

I	Pica	N. dulce	301-44B	Suave	+	-	+	-	-	+	+
I	Pica	N. dulce	87-5	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
I	Pica	N. dulce	89-2	Moder.	+	-	+	-	+	-	-
I	Pica	N. dulce	334	Suave	+	-	+	+	-	+	-
I	Pica	N. dulce	88-2	Suave	+	-	+	+	+	+	-
I	Pica	N. dulce	337	Severa	+	-	+	-	+	-	-
I	Pica	Pomelo	42-3	Moder.	+	-	-	-	+	-	-
III	Vallenar	N. dulce	502	Suave	+	-	-	-	+	-	-
III	Vallenar	N. dulce	281-1	Suave	+	-	+	-	-	-	-
IV	Ovalle	Limonero /SP**	494	Suave	+	-	+	+	+	-	-
IV	Ovalle	Limonero /SP**	495	Suave	+	NE	NE	+	-	-	-
IV	Ovalle	Limonero /SP**	497	Suave	+	-	-	+	+	+	-
IV	Ovalle	Limonero	496	Suave	+	-	-	-	+	-	-
V	Limache	N. dulce	305-1	Suave	+	-	+	-	+	-	-
V	Limache	N. dulce	305-1B	Suave	+	-	-	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-8B	Suave	+	-	-	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-15B	Moder.	+	-	+	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-3	Suave	+	-	-	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-7	Moder.	+	-	+	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-8	Suave	+	NE	NE	-	-	+	-
V	Limache	N. dulce	305-11	Suave	+	-	-	-	+	-	-
V	Limache	N. dulce	305-12	Suave	+	NE	NE	-	-	+	-
V	Limache	N. dulce	305-14	Suave	+	-	+	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-16	Suave	+	NE	NE	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-18	Suave	+	-	+	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-19	Moder.	+	NE	NE	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-5B	Moder.	+	-	+	-	-	+	-
V	Limache	N. dulce	305-6B	Suave	+	-	-	-	-	+	-
V	Limache	N. dulce	305-19B	Suave	+	-	+	-	+	-	-
V	Limache	N. dulce	305-4	Suave	+	-	-	-	-	-	-
V	Limache	N. dulce	305-2	Suave	+	-	-	-	-	-	-
RM	Buin	Limonero	366	Suave	+	-	-	-	-	-	-
RM	Melipilla	N. dulce	351	Suave	+	-	-	-	-	-	-
RM	Melipilla	N. dulce	349	Suave	+	-	+	-	+	-	-
RM	Paine	N. dulce	368	Suave	+	-	-	-	-	-	-
RM	Paine	N. dulce	369	Suave	+	-	-	-	-	-	-
VI	Doñihue	N. dulce	492	Suave	+	-	+	-	-	-	-
VI	L. Cabras	N. dulce	467	Moder.	+	-	+	-	+	-	-
VI	Lolol	N. dulce	490	Moder.	+	-	+	-	+	-	-
VI	Rancagua	N. dulce	462	Suave	+	-	+	-	+	-	-
VI	Rancagua	N. dulce	461	Suave	+	-	+	-	+	-	-
VI	Rancagua	N. dulce	463	Suave	+	-	+	-	+	-	-
VI	Rancagua	N. dulce	464	Severa	+	-	+	-	+	-	-
VI	Peumo	N. dulce	389	Suave	+	-	+	-	+	-	-
VI	Peumo	N. dulce	503	Suave	+	NE	NE	-	-	-	-
VI	Peumo	N. dulce	504	Moder.	+	NE	NE	-	-	+	-
VI	Sta. Cruz	N. dulce	460	Suave	+	-	-	-	-	-	-
VI	Peraiillo	Limonero	491	Suave	+	-	-	-	+	-	-

Porcentaje (%) de aislados con reacción (+) en planta indicadora.

100 (%) 100 0 61 11 40 33 6

VC, Aclareamiento de venas. Suave= leve de aclaramiento de venas, 1-2 lesiones/hoja; Moderada= entre de 3-10 lesiones/hoja; Severa= más de 10 lesiones/hoja.

SP, Acanaladuras en la madera; DI, Decaimiento de plantas de naranjo dulce injertado en naranjo agrio; SY, Amarillez de plántulas ("seedling yellows"), ND/NA, Plantas de naranjo dulce injertadas sobre naranjo agrio.

*NA/ND, Yema de naranjo agrio injertada sobre naranjo dulce, propuesta por Pina *et al.* (2004).

**Síntoma de SP en *C. macrophylla*; NE, No efectuada la prueba DI. RM= Región Metropolitana. + = presencia del síntoma descrito; - = ausencia del síntoma descrito.

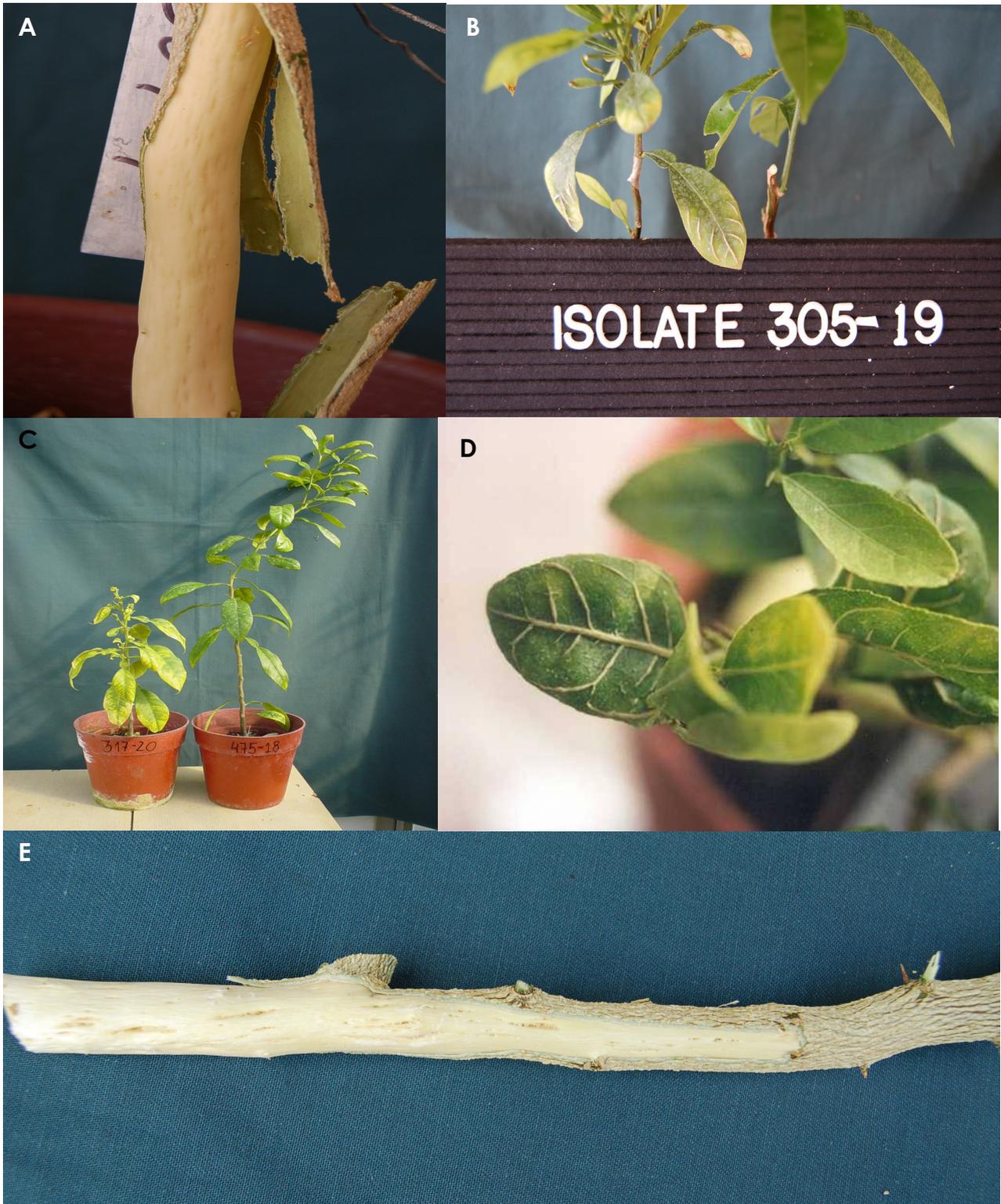


FIGURA 3.3. Síntomas desarrollados en pruebas biológicas. A. Síntoma de acanaladura de la madera en planta de naranjo dulce cv. Madame Vinous inoculada con aislado. B. Acorchamiento de vena desarrollada en planta de naranjo amargo. C. Izq, síntoma amarillez de plántulas ("seedling yellows") desarrollado en planta de naranjo de semilla. D. Síntoma de acorchamiento de venas desarrollado en lima mejicana. E. Acanaladuras en la madera desarrolladas en lima mejicana.

CUADRO 3.6. Grupos biológicos* obtenidos mediante la caracterización biológica de cien aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

Perfiles de síntomas(*)	Lima mejicana	DI** naranja amargo/ naranja dulce	SY en naranja agrio	SP en naranja dulce	SP en pomelo cv. Duncan	Nº de aislados chilenos agrupados
1	+	+	+	+	+	0
2	+	+	+	+	-	2
3	+	+	+	-	+	2
4	+	+	+	-	-	18
5	+	+	-	-	+	4
5'	+	+	-	+	-	2
6	+	+	-	+	+	0
7	+	+	-	-	-	33
8	+	-	+	+	+	0
9	+	-	+	-	+	1
10	+	-	+	-	-	5
11	+	-	-	+	+	0
12	+	-	-	-	+	3
13	+	-	-	-	-	20
14	-	-	-	-	-	0
ND						10
TOTAL						100

*Clasificación de grupos biológicos de CTV propuesta por Hilf *et al.* (2005), modificada mediante la incorporación de la clasificación 05' y el 14 propuesto, este último, por Garnsey *et al.* (1987).

**Prueba biológica para determinar DI propuesta por Pina *et al.* (2004).

DI= "Decline inducing"

SY= "Seedling yellows"

SP= "Stem pitting"

ND= No determinado (no efectuada la prueba DI).

3.3 CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA DE AISLADOS CHILENOS

3.3.1 Introducción

Los primeros intentos de caracterización serológica se efectuaron con anticuerpos policlonales. Posteriormente Vela *et al.* (1986), produjeron y emplearon anticuerpos monoclonales (AMCs) específicos para la detección y caracterización de CTV, demostrando que la combinación 3DF1 y 3CA5, era capaz de detectar todos los aislados de CTV reconocidos hasta la fecha (Cambra *et al.*, 1990). La característica de la cubierta proteica de CTV de presentar múltiples epítomos, permitió a Permar *et al.* (1990), desarrollar un anticuerpo monoclonal (MCA13) capaz de reaccionar con aislados considerados agresivos en Florida (EE.UU.). La producción de este anticuerpo se basó en el uso del aislado T36, capaz de producir una moderada reacción en lima mejicana, una moderada reacción de amarillez de plantas en naranjo amargo y ligeras acanaladuras en naranjo dulce y pomelo, y ser transmisible mediante *A. gossypii*. Este anticuerpo reaccionó con los aislados: SY-568, SY-576, T-388, T-68, T-36 y T-66a, y no reaccionó con los aislados: T-514, T-300, T-4, T-516, T-26, T-30 y T-385. Los aislados frente a los que reaccionó, son capaces de causar decaimiento en naranjo dulce sobre amargo, amarillez de plantas en naranjo amargo y/o acanaladuras en pomelo o en naranjo amargo, mientras que el resto sólo fue capaz de causar síntomas en lima mejicana.

El epítomo reconocido por el MCA13 fue mapeado *in vitro* por Pappu *et al.* (1994). La mutación de un solo nucleótido resultó en un cambio de fenilalanina a tirosina en la posición 124 de aminoácidos de la cubierta proteica, lo que produjo que aislados con esta mutación no fueran reconocidos por MCA13. De acuerdo a los resultados obtenidos por Satyanarayana *et al.* (2005), al inocular viriones con esta mutación, no reactivos al MCA13, igual fueron capaces de inducir síntomas en lima mejicana, *Citrus macrophylla* y naranjo amargo, sugiriendo estos autores que la agresividad de los aislados de CTV no es específica del epítomo reactivo del MCA13 (Satyanarayana *et al.*, 2005).

Irey *et al.* (1988) y Permar y Garnsey (1991) encontraron entre un 90 y 95% de correspondencia entre la agresividad de aislados de CTV y la reacción de éstos con el MCA13. Lin *et al.* (2002) al trabajar con pomelos previamente inoculados con aislados suaves, que a su vez eran ELISA-MCA13 negativos, cuatro de éstos presentaron una reacción positiva mediante la técnica ensayo inmunoenzimático *in situ* con el anticuerpo

MCA13 (ISIA-MCA13), lo que denotaría la presencia de infecciones mixtas, en donde predominaría el aislado suave.

Vela *et al.* (1986 y 1988) describieron que CTV poseía tres epítomos que se encontraban en todos los aislados de CTV, representados por: 3DF1, 3CA5 y 3BH6. Posteriormente, Garnsey *et al.* (1987) definieron dos epítomos más. Se han definido al menos nueve epítomos en la capsida de CTV, demostrándose que ninguno es universal. Por tanto, no hay disponible un anticuerpo monoclonal capaz de detectar todos los aislados de CTV conocidos hasta la fecha (Cambra *et al.*, 1991a). Estudios efectuados en España (Cambra *et al.*, 1991), han demostrado que el grupo más abundante de aislados de CTV, está constituido por aislados de virulencia media a baja y que no son reconocidos por los anticuerpos monoclonales MCA13 ni 3E10 (este último de Tsai y Su, 1991).

Cambra *et al.* (1993), mediante el empleo de nueve anticuerpos monoclonales diferentes, y del análisis de un total de 59 aislados de CTV detectaron seis epítomos distintos, lo que dió origen a siete serogrupos diferentes. En este trabajo se observó que cinco anticuerpos reconocieron a todos los aislados españoles analizados. Cambios en la composición de epítomos, observados en algunos aislados luego de ser transmitidos por pulgones o luego de la propagación en algunos hospederos mediante injerto, indican que algunos aislados de campo son mezclas o poblaciones de aislados diferentes.

En las condiciones de España, la reacción con MCA13 no se correlacionó con la presencia de síntomas de decaimiento (Cambra *et al.*, 1993). El MCA13 es, no obstante, un buen indicador o marcador de virulencia. La mayoría de los aislados agresivos (capaces de provocar "stem pitting" en naranjo dulce o pomelo) son reconocidos por este anticuerpo y por tanto, su reacción positiva indica que, probablemente, se trata de un aislado agresivo. En Florida (EE.UU.) la reacción con MCA 13 puede diferenciar si se trata de aislados que inducen decaimiento (tipo T36) o no (tipo T30), aunque esta correlación no se da en otras zonas citrícolas con mayor variabilidad de CTV.

Los aislados de CTV presentes en el campo, son frecuentemente un complejo de aislados, es decir, pueden contener una mezcla de aislados suaves y agresivos (Brlansky *et al.* 2003). Estos autores realizaron transmisiones mediante un único individuo de *T. citricida* y/o sucesivas transmisiones, separando de este modo los aislados de campo en diversos subaislados. Algunos aislados que originalmente reaccionaban en forma

negativa a MCA13, dieron origen a subaislados que reaccionaron en forma positiva a este anticuerpo, como ya habían descrito Cambra *et al.* (1993).

Por otro lado, Nikolaeva *et al.*, (1998), analizaron 76 aislados de CTV de 20 países, en donde se incluían 35 aislados capaces de causar SP en naranjo dulce, analizados mediante ELISA-DASI usando diferentes combinaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales. Las combinaciones empleadas cumplían el propósito de atrapar y detectar aislados de CTV en forma diferenciada, entre éstos los anticuerpos policlonales 109 y 110. Estos últimos cuando fueron empleados para atrapar CTV, fueron capaces de reconocer sólo los aislados que inducían SP en naranjo dulce. Sin embargo, estos anticuerpos fueron incapaces de discriminar entre aislados causantes de acanaladuras en pomelo. Este resultado estaría en concordancia con evidencias que sugieren que estos síndromes poseerían determinantes genéticos independientes (Garnsey *et al.*, 1991). No obstante, el sistema que propuso no se utiliza por no ser fiable en el reconocimiento exclusivo de aislados agresivos capaces de causar SP.

El AMC 3E10 (Tsai *et al.*, 1993), presenta un comportamiento similar al MCA13, puesto que también reconoce, básicamente, aislados agresivos de CTV (Cambra *et al.*, 1993).

Considerando estos antecedentes, en este capítulo se buscó caracterizar serológicamente los 100 aislados chilenos de CTV (ya caracterizados biológicamente) con un amplio panel de anticuerpos monoclonales de todos los orígenes posibles, para establecer serogrupos y comprobar si existía alguna asociación con la severidad de los aislados chilenos manifestada en invernadero y con observaciones de los mismos en campo.

3.2 Materiales y Métodos

La caracterización serológica fue realizada mediante ELISA-DASI (Cambra *et al.*, 1991b, 1993) mediante el empleo de 12 anticuerpos monoclonales (AMCs), utilizándose la colección conservada en el Laboratorio de Virología e Inmunología del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, IVIA. Se emplearon los siguientes anticuerpos: 3DF1, 3CA5 y 3BH6 de España (Vela *et al.*, 1986), MCA13 de Florida (EE.UU.) (Permar *et al.*, 1990), C1F10 de Cuba (Batista, 1994), ECTV 176 y ECTV178 de Florida (EE.UU.) (no publicado), 3E10 y 4H6H de Taiwán (Tsai *et al.*, 1993), α CTV4E5- α 1, α CTV4B1-3 y α CTVF3- α 1 de Marruecos (Zebzami, *et al.*, 1993).

Se analizaron los cien aislados de CTV de diferentes orígenes, previamente caracterizados biológicamente (ver capítulo 3.2 y cuadro 3.5 de esta tesis). Los aislados de CTV se inocularon por injerto en plantas de lima mejicana o naranjo dulce cv. Madame Vinous. Se comprobó el éxito de la transmisión de CTV mediante IIP-ELISA. Como controles positivos se utilizaron: el aislado de CTV suave T-300, representativo de aislados del Mediterráneo (Ballester-Olmos *et al.*, 1993) el aislado T-388, correspondiente a un aislado agresivo de origen japonés (Tsai y Su, 1991); y el aislado T-397-P, el cual fue obtenido mediante transmisión por pulgón y defectivo del epítipo reconocido por el anticuerpo 3DF1 (Cambra *et al.*, 1993). Se emplearon plantas sanas como controles negativos. Los extractos fueron preparados homogenizando las muestras de material vegetal, 1:10 p/v (muestra/tampón de extracción). ELISA-DASI se realizó según Cambra *et al.* (1993). Las placas ELISA (Nunc Polisorp), fueron tapizadas con inmunoglobulinas policlonales 879 a dosis de 1 μ g/ml. Los AMCs se utilizaron a dosis de: 3DF1 (0,05 μ g/ml); 3CA5 (0,05 μ g/ml); MCA13 (1/10.000 de líquido ascítico); 3BH6 (0,25 μ g/ml); C1F10 (0,25 μ g/ml); 4H6H (0,5 μ g/ml); ECTV-176 (1,0 μ g/ml); ECTV-178 (1/1.000 de líquido ascítico previamente diluido); 4F3 α 1 (0,2 μ g/ml); 3E10 (1/5.000 de líquido ascítico); α CTV4E5- α 1 (0,1 μ g/ml) y α CTV4B1-34F3 (0,1 μ g/ml) en PBS pH 7,2-7,4. La densidad óptica (DO₄₀₅) fue medida a los 60 minutos en un lector Titerek Multiskan (Flow). Se consideraron como muestras positivas aquellas cuyo DO₄₀₅ fue dos veces superior a la DO₄₀₅ promedio de los controles negativos.

3.3.3 Resultados y Discusión

En el Cuadro 3.7 se describen los ocho serogrupos establecidos con los 100 aislados chilenos de CTV, previamente caracterizados en forma biológica, los que fueron obtenidos mediante análisis ELISA-DASI empleando 12 AMCs diferentes. La mayoría (57%) de los aislados de CTV chilenos estudiados reaccionaron frente a todo el panel de AMCs utilizados, y fueron clasificados como serogrupo 1. El segundo grupo en importancia fue el serogrupo 2, compuesto por aislados (36%) de CTV que reaccionaban a todos los AMCs excepto con MCA13. Así pues, el 93% de los aislados de CTV estudiados, reaccionó frente a un amplio panel de AMCs sugiriendo mezcla o población de aislados de CTV.

El 100% de los aislados fueron reconocidos por la mezcla de AMCs 3DF1 + 3CA5 descrita como universal (Cambra *et al.*, 1991). Los MCAs que pudieron detectar todos los aislados chilenos fueron: 3DF1 y 3BH6 de España (Vela *et al.*, 1986), α CTV4E5-a1 y α CTV4B1-3 de Marruecos (Zebzami *et al.*, 1993) (Cuadro 3.7). No obstante, dos aislados, uno de limonero procedente de Ovalle (IV Región) y otro de naranjo dulce de Vallenar (III Región), no reaccionaron frente al AMC 3CA5 considerado de amplio espectro. Se han descrito muy pocos aislados de CTV defectivos del epítipo 3CA5.

El 60% de los aislados estudiados resultaron MCA13 positivos, casi todos provenientes de la I Región (Cuadros 3.7 y 3.8), excepto dos de Ovalle (IV Región). Por el contrario, todos los aislados de la zona Central de Chile fueron MCA13 negativos, con excepción de los dos aislados antes mencionados.

En el grupo serológico 1, se agrupan los aislados que presentan la mayor agresividad biológica, los que a su vez corresponden a aislados obtenidos de plantas con síntomas, y asociados al síndrome de acanaladuras de la madera (Figuras 3.3A, 3B y 3C). Los aislados pertenecientes a los grupos 3 a 8, posiblemente contengan poblaciones más simples que los grupos 1 y 2. También podrían proceder de poblaciones más complejas tras transmisión por pulgón (Cambra *et al.*, 1993). En relación a los aislados de referencia empleados, la cepa T-300 tuvo el comportamiento descrito por Cambra *et al.* (1993), y fue clasificada dentro del grupo 2. Por otro lado, las cepas T-388 y T-397, reaccionaron positivamente frente a todos los anticuerpos, siendo clasificados dentro del grupo serológico 1, mientras que el aislado defectivo del epítipo 3DF1, T-397-P, efectivamente, no reaccionó con el anticuerpo 3DF1 ni con el anticuerpo 3BH6.

De todos los aislados pertenecientes a la zona central de Chile, sólo cuatro fueron MCA13 positivos, lo que corresponde a un 4% de los aislados, tres de Ovalle (IV Región) y uno de Limache (V Región). Éstos fueron agrupados dentro de los serogrupos 1 y 3 (Cuadros 3. 7 y 3. 8). De éstos aislados, los procedentes de Ovalle obtenidos a partir de árboles de limonero injertados sobre *C. macrophylla*, mostraban síntomas de menor vigor y acanaladuras en la madera en el portainjerto (Figura 3.2E), y fueron IIP-ELISA positivos tanto la variedad como corteza del portainjerto. Tres aislados procedentes de estos árboles fueron analizados biológica y serológicamente y causaron reacción de "seedling yellows" en naranjo amargo, "stem pitting" en pomelo Duncan, y fueron MCA-13 positivos (Cuadro 3.8). Estos resultados indican la presencia de aislados agresivos de CTV en la zona central de Chile. Sin embargo, éstos se encuentran localizados en un huerto de limonero, aislado de otros huertos de cítricos, y su dispersión es posible que sólo ocurra mediante pulgones que se alimenten de brotes vigorosos o "rebotes" del portainjerto. Es interesante destacar que durante cuatro años de seguimiento a estos árboles (véase apartado 3.5), no ha aparecido ningún nuevo árbol positivo a CTV, confirmando la dificultad de dispersión de CTV a partir de brotes de limonero infectado (Figura 3.6).

Por otro lado, de los 61 aislados aislados que dieron reacción de DI (proposición de Pina *et al.*, 2004) en naranjo amargo /naranjo dulce, 44 de éstos fueron además MCA13 positivos, mientras que de los 11 aislados que dieron reacción de SP en pomelo cv. Duncan, 10 dieron reacción MCA13 positiva y en el caso de los seis aislados que fueron SP positivos en naranjo dulce todos fueron MCA13 positivos (Cuadro 3.8).

Finalmente el AMC 3E10, no fue capaz de discriminar entre aislados agresivos y suaves (Cuadro 3.7), lo que no concuerda con lo observado por Tsai *et al.*, (1993), quienes encontraron un comportamiento similar al MCA13.

CUADRO 3.7. Serogrupos (8 en total) establecidos con 100 aislados chilenos de CTV, previamente caracterizados biológicamente, obtenidos mediante análisis ELISA-DASI empleando 12 anticuerpos monoclonales diferentes.

Grupo Serológico	Aislados chilenos de CTV (%)	Anticuerpos monoclonales (AMCs)*											
		3DF1	3CA5	C1F10	ECTV176	ECTV178	4F3a1	3E10	4E5- α 1	4B1-3	4H6H	3BH6	MCA 13
1	57	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	34	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
3	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
4	1	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
5	1	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
6	1	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
7	1	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-
8	2	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Aislados reconocidos por cada AMC		100	98	99	95	98	97	100	100	93	100	100	60

*3DF1, 3CA5 y 3BH6 de España (Vela *et al.*, 1986), C1F10 de Cuba (Batista *et al.*, 1994), ECTV-176 y ECTV-178 de Florida (EE.UU.) (no publicado), 4F3a1 y 4E5a1 de Marruecos (Zebzami *et al.*, 1993), 3E10 y 4H6 de Taiwán (Tsai *et al.*, 1993), y MCA13 de Florida (EE.UU.) (Permar *et al.*, 1990).

CUADRO 3. 8. Caracterización biológica y serológica de 100 aislados de CTV chilenos, en donde la se representa con colores los 8 serogrupos obtenidos.

				PRUEBAS BIOLÓGICAS									
Región	Localidad	Hospedador/ síntoma en campo	Aislado	Lima mejicana		ND/NA NA/ND*		Pomelo		N. agrio	N. dulce	Sero- grupo	MCA 13
				VC	SP	DI	DI	SP	SY	SY	SP	Tipo	
I	Azapa	N. dulce	232-2	Suave	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Azapa	N. dulce	231-1	Severa	+	NE	NE	-	-	+	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	101-2	Severa	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	101-3	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	101-4	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	101-5	Suave	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	101-6	Severa	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Comiña	N. dulce	301-34	Severa	+	-	+	-	+	-	+	1	+
I	Comiña	N. dulce	301-34B	Suave	+	NE	NE	-	-	-	+	1	+
I	Matilla	Pomelo	179-1	Severa	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-5	Moder.	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-3	Severa	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-1	Severa	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-7	Severa	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-21	Severa	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-25B	Suave	+	-	-	-	+	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	301-30B	Suave	+	-	-	-	-	-	-	1	+
I	Matilla	L. mejicana /VC	96-6	Severa	+	-	+	+	+	-	-	1	+
I	Matilla	N. dulce	240-1	Suave	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Matilla	N. dulce	244-1	Suave	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Matilla	Tangelo	246-2	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	525	Severa	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	509	Suave	+	-	+	+	+	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	42-4	Moder.	+	-	-	+	+	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	92-2	Moder.	+	-	-	+	-	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	507	Severa	+	-	+	+	+	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	508	Suave	+	-	+	-	-	-	+	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	510	Moder.	+	-	-	+	+	-	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	511	Severa	+	-	+	-	+	+	-	1	+
I	Pica	Pomelo	512	Moder.	+	-	-	-	-	+	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	514	Suave	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	516	Moder.	+	-	-	-	-	+	-	1	+
I	Pica	Pomelo /SP	517	Moder.	+	-	-	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-2	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-6	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	84-1	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	95-3	Moder.	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	95-5	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	95-6	Suave	+	-	-	-	-	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	106-3	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	106-4	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	106-5	Suave	+	-	+	-	-	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	85-1	Suave	+	-	+	-	+	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-5	Severa	+	-	-	-	+	+	+	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-9	Severa	+	-	-	-	+	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	301-11	Moder.	+	-	-	-	+	-	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	327	Moder.	+	-	+	-	+	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	521	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	524	Suave	+	-	+	-	-	+	+	1	+
I	Pica	L. mejicana /VC	83-3	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	N. dulce	301-41B	Suave	+	-	+	-	+	+	-	1	+
I	Pica	N. dulce	301-44B	Suave	+	-	+	-	-	+	+	1	+
I	Pica	N. dulce	87-5	Moder.	+	-	+	-	-	+	-	1	+
I	Pica	N. dulce	89-2	Moder.	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Pica	N. dulce	334	Suave	+	-	+	+	+	+	-	1	+
III	Ovalle	Limonero /SP**	495	Suave	+	NE	NE	+	-	-	-	1	+
V	Limache	N. dulce	305-1	Suave	+	-	+	-	+	-	-	1	+
I	Pica	N. dulce	88-2	Suave	+	-	+	+	+	+	-	2	-
III	Vallenar	N. dulce	502	Suave	+	-	-	-	+	-	-	2	-
V	Limache	N. dulce	305-1B	Suave	+	-	-	-	-	-	-	2	-
V	Limache	N. dulce	305-8B	Suave	+	-	-	-	-	-	-	2	-
V	Limache	N. dulce	305-15B	Moder.	+	-	-	-	-	-	-	2	-

3.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS CHILENOS

3.4.1 Introducción

Karasev *et al.* (1995) secuenciaron el genoma completo del aislado agresivo de CTV T36 de Florida, EEUU. Hasta la fecha se han secuenciado completamente un total de nueve aislados (véase apartado 1.5.2). Los viriones largos y flexuosos de los closterovirus poseen una arquitectura bipolar única que incorpora dos proteínas de la cubierta, la mayor parte de la nucleocapsica está cubierta por la proteína de 25 kDa (95%), mientras que la segunda de 25 kDa encapsida nucleotidos del extremo terminal 5' del gRNA (5%), dando al virión la apariencia de una serpiente de cascabel "rattlesnake-like" (Satyanarayana *et al.*, 2004; Moreno 2007). Recientemente se demostró que la p27 inicia la encapsidación desde el extremo 5' del gRNA (Satyanarayana *et al.*, 2004; Fagoaga *et al.*, 2005). La proteína p23 (que no existe en otros closterovirus) fue estudiada por López *et al.* (2000) demostrando que posee la función de ligar RNAs de forma inespecífica. Esta proteína está aparentemente asociada a la patogenicidad, así plantas de lima mejicana que expresaban en forma constitutiva la proteína, mostraron los mismos síntomas que el aislado T36. La intensidad de los síntomas se ha asociado con la acumulación de la proteína p23 (Ghorbel *et al.*, 1998). Sin embargo, trabajos efectuados por Fagoaga *et al.* (2005), demostraron que la inducción de síntomas por p23 era específica de los cítricos, pero no está relacionada con la virulencia del aislado.

Se han realizado diversos intentos con el propósito de determinar diferencias entre aislados mediante técnicas moleculares. Como referencia el realizado por Cevik *et al.* (1996a) para clasificar aislados mediante PCR Bi-Direccional (BD/PCR), que consiste en emplear dos iniciadores internos, uno específico para aislados suaves y otro para aislados agresivos (MCA13 positivos), más dos iniciadores terminales del final del gen de la cubierta proteica. La especificidad del anticuerpo MCA13 se basa en un cambio de nucleótido en la posición 371 (A/T) del gen de la proteína de la capsida. Sin embargo, estos autores señalan una posible deficiencia de este método y su dependencia en el residuo T en la posición antes señalada, ya que aislados agresivos que contengan un nucleótido diferente en esa posición pueden no ser detectados por MCA13, ni por la secuencia basada en este epítipo, oligonucleotido CN218, usada en BD/PCR. Estudios efectuados mediante la clonación de la proteína de la cubierta de aislados agresivos de limoneros Meyer, demostraron la similitud de secuencia de estos aislados con el aislado T36 (Cevick *et al.*, 1996b).

Una aproximación a la clasificación o agrupamiento de aislados de CTV mediante técnicas moleculares fue realizado por Hilf *et al.* (1999), mediante pares de marcadores específicos de diferentes secuencias de aislados de CTV. Así agrupó 11 aislados de CTV en 3 tipos diferentes: el tipo T30 (aislado suave obtenido de lima mejicana), el tipo T3 (aislado causante de DI en Florida (EE.UU.) obtenido de un árbol de lima); y el tipo T36 (causante de DI originalmente obtenido de naranjo dulce). Sin embargo, al comparar la secuencia de DNA complementaria (cDNA) de los aislados T3, T30 con el aislado VT de Israel, mostraron una distribución simétrica o relativamente consistente de identidad de secuencia de nucleótidos en las regiones 5' y 3' del genoma de 19,2 Kb. En contraste, comparaciones de estas secuencias con la secuencia del aislado T36 mostró una notoria diferencia en la identidad de la secuencia del extremo proximal 5'. Por lo tanto, en este trabajo proponen la creación de dos grupos de CTV, representados por los aislados VT y T36. Esto ya había sido reportado por Mawassi *et al.* (1996), quienes demostraron que estos aislados poseían aproximadamente un 89% de identidad en el ORF 10 del extremo 3', pero sólo 60-70% de identidad en el ORF 1. Por otro lado, López *et al.* (1998) mediante un estudio basado en polimorfismo de la región no traducida del extremo 5', fueron capaces de agrupar aislados de CTV en tres grupos diferentes, quedando agrupados en el grupo I los aislados agresivos T36 y T388-7, en el grupo II aislados agresivos tipo VT, 388-6 y T318-6, y en el grupo III aislados considerados biológicamente suaves.

Hilf y Garnsey (2002), propusieron una clasificación de aislados de CTV, mediante iniciadores de PCR múltiples. Este estudio involucró el uso de un iniciador universal, obtenido de la zona que codifica para la cubierta proteica del aislado T-36, y un total de diez pares de iniciadores. De ellos tres representan la región de la polimerasa, la región K17 y extremo 5' de los aislados T-36, T-30 y VT, y un par de iniciadores más, representando la zona K17 del aislado T-3. Se analizaron un total de 44 aislados de CTV, 10 obtenidos de Florida (EE.UU.) y 34 aislados foráneos obtenidos de diferentes orígenes (Israel, India, Sudáfrica, La Reunión y Córcega/ Francia, Tailandia, Colombia, Brasil, Taiwán, Hawaii, Costa Rica, Tanzania, Cuba, España, Guatemala, Australia, China, Venezuela, Bermudas, Jamaica y Japón). En este estudio se clasificaron los aislados en 14 grupos diferentes, aunque la mayoría resultaron ser variantes de los aislados T3, T30, T36 y VT.

Brlansky *et al.* (2003), trabajaron con el mismo conjunto de iniciadores de PCR propuesto por Hilf y Garnsey (2002) y con aislados y sub-aislados obtenidos mediante la transmisión con *Toxoptera citricida*. Encontraron que a partir de aislados agresivos era posible encontrar subaislados suaves y agresivos, y también confirmaron el hecho de encontrar

subaislados agresivos obtenidos a partir de aislados considerados suaves (tanto por pruebas biológicas como serológicas).

La metodología de Hilf y Garnsey (2000), se ha adaptado para clasificar y caracterizar los 100 aislados chilenos de CTV, previamente caracterizados biológica y serológicamente. El objetivo último fue evaluar si existe una correlación con los resultados obtenidos en la caracterización biológica y serológica de los mismos y tratar de relacionarla con los síntomas de campo.

3.4.2 Materiales y Métodos

Aislados de CTV. En este estudio se empleó un total de 100 aislados chilenos de CTV, que fueron obtenidos mediante una prospección nacional, y caracterizados en forma biológica y serológica (Apartados 3.2 y 3.3 de esta tesis) (Cuadro 3.8). Plantas de naranjo dulce cv. "Madame Vinous" o lima mejicana, se inocularon con los diferentes aislados. Se comprobó la presencia de un título adecuado de CTV mediante IIP-ELISA (PlantPrint Diagnostics). Finalmente se recolectaron 0,5 g de tejido por muestra a analizar, se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron. Como controles positivos se emplearon los aislados: T-300, detectado en una planta de lima mejicana naturalmente infectada en España, y que presentó una alta tasa de transmisión (Ballester-Olmos *et al.*, 1993); T-302, encontrado en una planta de vivero de mandarina Satsuma naturalmente infectada, es un aislado suave que no induce acanaladuras en la madera y es eficientemente transmitido mediante *A. gossypii*; T-388 obtenido en España por Ballester-Olmos *et al.* (1993); T-3, obtenido de lima mejicana por Grant y Higgins (1957), es un aislado capaz de causar el síndrome de decaimiento rápido y de acanaladuras de la madera (DI y SP); T-30, fue obtenido a partir de árboles de naranjo dulce en Florida (EE.UU) y considerado como un aislado atenuado; T-36, aislado de un árbol naturalmente inoculado mediante pulgones en un huerto que presentó una severa epidemia de muerte de plantas por tristeza en Florida; y VT, obtenido en Israel a partir de un árbol de naranjo Valencia (Bar-Joseph y Loebenstein, 1973).

Preparación de extractos. La extracción de CTV se realizó, mediante el empleo de tampón de extracción a partir de tejido liofilizado. Se tomó una muestra de 0,5 g, se añadieron 4 ml de tampón de extracción (0,14 M de tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 7,4, suplementado con sodio dietyl ditiocarbamato (DIECA) o mercaptoetanol al 0,2%) (Cambra *et al.*, 1991b), y homogenizó en bolsas individuales de polietileno (Bioreva) mediante un equipo Homex 6000 (Bioreba).

Extracción de RNA viral. Con el propósito de obtener una suficiente cantidad de RNA viral se utilizó el método RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) (OEPP/EPPO, 2004). La metodología consistió básicamente en: a 200 µL del extracto bruto en un tubo eppendorf de 1,5 ml, se le agregó 350 µL de tampón RLT (RNeasy® Lysis buffer, Qiagen), se le dieron cinco pulsos ("vortex"), se incubó en un bloque termostático (Techne Dri-block DB-2D) a una temperatura de 56°C por 1-3 minutos, se pipeteó el contenido y se centrifugó a 13.000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf estéril, se añadieron

250 µL de etanol (96-100%), y luego se traspasaron 650 µL de la muestra a la columna del kit y se centrifugó por 15'' a 10.000 rpm. En este paso se eliminó el sobrenadante y se agregó el tampón de lavado RW1 a la columna, se cerró el tubo y se centrifugó por 15'' a 10.000 rpm, con el propósito de lavar la columna. Se hicieron otros dos lavados con 500 µl del tampón RPE y a continuación se eluyó el RNA con 50 µl de agua estéril. El RNA se congeló a -80 °C hasta ser utilizado (OEPP/EPPO, 2004).

RT-PCR. RT-PCR en un solo paso fue empleada utilizando los iniciadores Pin1/Pin2 (Olmos *et al.*, 1999) y los iniciadores descritos por Hilf *et al.* (2000), correspondientes a la secuencia del respectivo aislado (entre paréntesis figura el tamaño del amplicón esperado): T36CP (672), T36POL (714), T36K17 (409), T36-5' (500), T30POL (696), T30k17 (409), T30-5' (594), VTPOl (695), VTK17 (409), VT-5' (492), T3K17 (409). En síntesis, 25 µl de mezcla para RT-PCR (10mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.3% Triton X100 (w/v)), 1 µM de cada iniciador, 250 µM de dNTPs, 0,25 unidades de AMV-RT (Promega), 0,5 unidades de Taq Polimerasa (Promega) y 5 µl de molde de RNA, compusieron el cóctel de reacción. Posteriormente, se preparó un gel de agarosa (2%), se incorporó 12,5 µL del cóctel obtenido por carril para cada muestra, y se corrió el gel a 120 volts por 30 min. Se tiñió con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas mediante luz ultravioleta.

PCR a tiempo real. Los ensayos Taqman para RT-PCR a tiempo real fueron realizados en un ABI Prism 7000 Sequence Detection System software (Applied Biosystems). El cóctel de reacción contuvo una mezcla de 1 X Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 X MultiScribe y una mezcla inhibidora de RNase (Applied Biosystems), 1 µM de iniciador 3'UTR1 (5' CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC 3'), 1µM de iniciador 3'UTR2 (5' ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T 3'), 200nM TaqMan probe 181T (5' TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG 3') (Bertolini *et al.*, 2008) y 5µl de muestra. El protocolo de RT-PCR consistió en incluir en un solo paso a temperatura de 48°C, por 30 min, y 95°C por 10 min seguido por 45 ciclos de amplificación (95°C por 15'' y 60°C por 1 min). La adquisición y análisis de datos fueron realizados mediante el programa ABI Prism 7000 (Applied Biosystems). El umbral límite de detección fue establecido de acuerdo a las especificaciones establecidas por dicho programa.

3.4.3 Resultados y discusión

Todos los aislados chilenos estudiados proporcionaron un producto de amplificación en RT-PCR a tiempo real tras similar número de ciclos-Ct (datos no mostrados) y con los iniciadores universales T36CP en RT-PCR. Ello demuestra el carácter universal de ambos sistemas y una similar carga viral. Del análisis de los amplicones obtenidos por RT-PCR con 11 combinaciones diferentes de pares de iniciadores (Cuadro 3.9), es posible inferir que los aislados chilenos de CTV se tienden a agrupar en tres tipos: el tipo VT (28%), el tipo T-30 (21%), además de aislados que presentan zonas del genoma con amplicones del tipo T30 y tipo VT (7%) y finalmente, se estableció un grupo de aislados que sólo fueron reconocidos por el par de iniciadores universales obtenidos a partir de la cubierta proteica del aislado T36 (T36CP) (25%). Ello mostraría la posible existencia de aislados más puros y otros que podrían catalogarse como mezcla de aislados.

Existió correlación entre el tipo de aislado y la ubicación geográfica, es decir, el tipo VT se localizó principalmente en localidades correspondientes a la I Región de Chile, y coincide con la zona donde se han localizado importantes pérdidas o deterioro de árboles, especialmente asociados al síndrome o enfermedad conocida como acanaladuras de la madera o "stem pitting". Sólo un aislado del tipo VT, se localizó en la III Región de Chile, específicamente ubicado en un antiguo jardín de variedades, el que de acuerdo a información recopilada en el terreno, de este jardín de variedades se habría extraído material de pomelo para realizar nuevas plantaciones en los oasis de Pica y Matilla de la I Región.

Por otro lado, los aislados que proporcionan amplicones asociadas al tipo T30, se localizan en la zona central de Chile y coincide con el hecho de ser aislados que presentan la menor agresividad en la caracterización biológica. Además, estos aislados resultaron MCA13 negativos (Cuadros 3.5 y 3. 8), aunque algunos fueron capaces de causar amarillez de plántulas de naranjo agrio y pomelo e DI en naranjo dulce/naranjo amargo (Cuadro 3.8).

Finalmente, un total de 25 aislados de CTV, pertenecientes tanto a la I Región como a la zona central de Chile (Cuadro 3.9), no pudieron ser agrupados con ningún tipo de aislado. De hecho, los aislados españoles considerados como aislados suaves (T-300 y T302), también se amplificaron únicamente con los iniciadores de T36CP. Sin embargo, algunos de los aislados chilenos (509, 512, 516, 517 y 495) fueron capaces de producir

síntomas asociados a aislados agresivos en plantas indicadoras bajo condiciones de invernadero (Cuadro 3.8, Figura 3.3A). Estos síntomas se correlacionaron con síntomas observados en el campo (Figura 3.2). Ello sugiere la necesidad de contar con otro tipo de iniciador para reconocer este tipo de aislados y distinguirlos de aquellos aislados que presentan claras evidencias de ser atenuados (Cuadro 3.12), o la necesidad de realizar la prueba molecular directamente sobre el material procedente del árbol en terreno, ya que se han observado cambios en la patogenicidad o en el perfil de dsRNA cuando el aislado es traspasado desde una especie hospedera a otra distinta (Moreno *et al.*, 1993).

En el Cuadro 3.12 se muestra la clasificación general de los 100 aislados chilenos seleccionados y su caracterización biológica, serológica y molecular. Se comentan los resultados en el Capítulo 4 de discusión general.

CUADRO 3.9. Clasificación y caracterización molecular de aislados mediante el empleo de once pares de iniciadores de PCR según Hilf et al. (2005).

Aislados de CTV (%)	RT-PCR tiempo real	T36 CP	T3 K17	T30 5'	T30 K17	T30 Pol	T36 5'	T36 K17	T36 Pol	VT 5'	VT K17	VT Pol	Tipo de aislado CTV
28	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	VT
12	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	VT(5'+K17)
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	VT(K17+Pol)
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	VT(K17)
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	VT (5')
2	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	T30 (K17+Pol)
2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	T30(Pol)
17	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	T30(K17)
6	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	VT+(T30K17)
1	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	VT(5'+K17)+T30 (Pol)
25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sólo CPT36
1 (T-300)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sólo CPT36
1 (T-302)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sólo CPT36
1 (T-388)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	VT (5'+Pol)
1 (T-3)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	T3+VT (5'+Pol)
1 (T-30)	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	T30 (5'+K17+Pol)
1 (T-36)	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	T36 (5'+K17+Pol)
1 (VT)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	VT (5'+K17+Pol)
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Negativo
Total**	100	100	0	0	25	5	0	0	0	48	53	39	

* La reacción de amplificación se indica con + y su ausencia con -
 ** Total de aislados chilenos con reacción de amplificación positiva.

3.5 EPIDEMIOLOGÍA. ENSAYOS DE TRANSMISIÓN Y ANÁLISIS ESPACIO-TEMPORAL DE LA DISPERSIÓN DE CTV EN CHILE.

3.5.1 Introducción

En un país como Chile, aislado de otros países mediante importante barreras geográficas, en un principio se pensó que estaría libre de la enfermedad conocida como tristeza, ya que después de las epidemias ocurridas en Argentina y Brasil, nunca se observaron problemas de muerte de plantas con este virus (Weathers *et al.*, 1969; Besoain *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de las barreras fitosanitarias que Chile posee, CTV fue detectado asociado a limoneros Meyer a fines de la década de 1960 (Weathers y Sánchez, 1970), situación similar a la ocurrida en California (EEUU), e Israel (Bar-Joseph *et al.*, 1989). En el caso de CTV, el ingreso de este virus de una región a otra o país se ha debido principalmente a la introducción de material vegetal infectado (Silva-Vara *et al.*, 2001).

Por otro lado, la dispersión de CTV a nivel local se produce a través de pulgones. Parte de las potenciales especies vectoras de CTV están presentes en Chile (Prado, 1991) y, aunque en reducido número, siempre han existido huertos de naranjos dulces injertados sobre naranjo amargo ubicados en regiones agrícolas tradicionales de la zona Central de Chile. Una situación especial, ocurre en los oasis de Pica y Matilla, I Región (Figura 3.1), los que se encuentran rodeados por el desierto de Atacama, en donde se han observado serios daños en pomelos con síntomas de acanaladuras de la madera o "stem pitting" (véase apartado 3.1.3.1.).

En Chile se han descrito como plaga en cítricos: *A. craccivora*, *Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae*, *T. aurantii* y *A. gossypii* (Prado, 1991). Sin embargo, hasta la fecha no se ha detectado la presencia de la especie *T. citricida*. En ningún estudio ha sido abordada la dispersión, o que especies vectoras se encuentran asociados a CTV (Sánchez y Weathers, 1970; Weathers y Sánchez, 1970; Herrera *et al.*, 1995; Besoain *et al.*, 2000).

En diversos países donde CTV se encuentra presente, se ha estudiado la eficiencia de transmisión de especies vectores en forma experimental, aspecto que tampoco ha sido previamente estudiado en nuestro país.

En base a los antecedentes expuestos, este capítulo tuvo por objetivos: evaluar la eficiencia de transmisión de diez aislados chilenos de CTV representativos, mediante el

uso de *A. gossypii* como insecto vector, analizar la relación espacio-temporal de CTV en Chile en seis parcelas experimentales, tres ubicadas en la zona central de Chile y tres localizadas en los oasis de Pica y Matilla de la I Región, evaluar el número de pulgones que visitan tres parcelas experimentales, y estimar el porcentaje de pulgones virulíferos que visitan los predios en diferentes zonas ecológicas.

3.5.2 Materiales y Métodos

3.5.2.1 Ensayo 1. Transmisión de CTV mediante *A. gossypii* empleando plántulas de semilla.

Plantas donantes. Para la realización de este ensayo se emplearon 20 plantas de naranjo dulce cv. Madame Vinous como donantes (dos plantas por aislado), las que fueron inoculadas mediante 3 porciones de corteza en septiembre 2003, con diez aislados chilenos de CTV (Cuadro 3.11). Estas plantas fueron mantenidas en un invernadero climatizado a temperaturas entre 20 y 28 °C, y se les realizó un rebaje a 30 cm para estimular el crecimiento de brotes nuevos y determinar la presencia de CTV en éstos, mediante IIP-ELISA (véase posteriormente). La elección de los aislados fue realizada basándose en características y propiedades de los mismos, tales como: lugar de origen, severidad de síntomas y serogrupo (Cuadro 3.11). Otro factor que se consideró en la elección fue la especie en que se conservó el aislado, eligiéndose cinco procedentes de naranjo dulce cv. Madame Vinous y cinco de lima mejicana. Además, se dejaron diez plantas como testigos negativos por cada especie de planta empleada.

Inmunoimpresión-ELISA (IIP ELISA). La prueba se efectuó en todos los brotes realizando un corte transversal, imprimiendo éstos en membranas de nitrocelulosa. Las membranas se revelaron según el método descrito en Cambra *et al.* (2000b) y OEPP/EPPO (2004), utilizando un kit comercial (PlantPrint Diagnostics).

Plantas receptoras. Se emplearon 110 plantas de semilla de seis meses de desarrollo de lima mejicana y 110 plantas de semilla de naranjo dulce cv. Madame Vinous. Es decir, se emplearon diez plantas de cada especie por aislado, dejando 10 plantas de cada especie como testigo.

Cría de *Aphis gossypii*. Se colectaron colonias pequeñas (dos a tres ninfas en las que se identificó *A. gossypii* como adulto alado). Las ninfas fueron puestas, por medio de un pincel, en cotiledones de plantas de algodón para su multiplicación, hasta obtener un total de plantas de algodón con una población aproximada de 14.000 pulgones. La crianza de pulgones se realizó bajo condiciones controladas de invernadero (a temperatura de 18-26°C), realizando cambios cada diez días a nuevas plantas para evitar la aparición de individuos alados por agotamiento del sustrato. Las plantas de algodón fueron abonadas con urea, en dosis de 1g/litro, para obtener brotes más turgentes.

Transmisión de aislados de CTV. El proceso de adquisición de CTV se llevó a cabo en julio de 2004, para lo cual se adhirió a cada planta, donante mediante cinta adhesiva, un brote de algodón que contenía aproximadamente 50 individuos de *A. gossypii*. En la medida que se iban colocando brotes infestados con los pulgones, éstos eran introducidos en un tubo de plástico, en cuyos extremos se colocó una malla antiáfido, cerrada en su parte apical, y en el otro extremo malla abierta a modo de poder introducir el brote y luego anudarla con cordel para evitar escape de los pulgones (ver Figura 3.4c). Al cabo de 24 horas de adquisición, los brotes fueron cortados, siendo inmediatamente adheridos a la planta receptora mediante una cinta adhesiva. Los pulgones se dejaron alimentar en estas plantas por espacio de 48 horas. Pasado este tiempo, se aplicó un insecticida sistémico para eliminarlos.

3.5.2.2 Ensayo 2. Transmisión de CTV mediante *A. gossypii* a brotes de plantas injertadas.

Plantas donantes y plantas receptoras. El procedimiento empleado fue similar al anterior ensayo, sólo que en este ensayo se emplearon yemas con inóculo de CTV (de cada aislado) según corresponda, lima mejicana o naranjo dulce cv. Madame Vinous. Las yemas infectadas con el respectivo aislado fueron injertadas en el portainjerto citrange Carrizo obtenido a partir de semillas. La selección de los aislados a traspasar se basó en los mismos criterios del ensayo anterior, sólo que se seleccionaron cuatro aislados conservados en cv. Madame Vinous y seis en lima mejicana.

La metodología empleada en el establecimiento de plantas de algodón, la captura, reconocimiento y cría de *A. gossypii*, y el proceso de adquisición-transmisión fue similar al descrito en el ensayo 1, salvo que se colocaron 200 pulgones por planta donante, es decir, se empleó un total aproximado de 44.000 pulgones.

Detección de CTV. En ambos ensayos se evaluó la eficiencia de transmisión de CTV a los tres y seis meses de realizada. Por este motivo se cortó un brote (3 a 6 cm) de cada una de las plantas receptoras, el que fue debidamente identificado y analizado mediante IIP-ELISA. En estas plantas se evaluó además la presencia/ausencia de síntomas en lima mejicana, tales como: aclaración de venas (VC) y acucharamiento de hojas (LC).

3.5.2.3 Análisis espacio-temporal

Diseño Experimental. Los datos fueron colectados desde árboles ubicados en los oasis de Pica y Matilla (I Región), entre los años 2001-2004. Las parcelas fueron diseñadas para contener un número aproximado a 400 árboles. Sin embargo, las parcelas en esa zona contienen una mezcla de árboles de diferentes especies de cítricos, por ejemplo, lima mejicana, naranjo dulce, pomelos, limoneros, tangelos, entre otras. Durante el tercer año de muestreo, la finca ubicada en el oasis de Matilla (I Región), el dueño decidió no regar los árboles, dejándolos secar, debido al alto costo del precio del agua y a la baja rentabilidad del huerto. En la zona central, se tomaron datos en los siguientes predios y localidades: uno ubicado en Ovalle (IV Región), entre los años 2003-2005; otro ubicado en Limache (V Región), el que fue muestreado desde 2000 hasta 2005; y un tercer predio ubicado en Paine (Región Metropolitana), muestreado entre los años 2003-2004. Este huerto fue eliminado a mediados del 2004, debido a que el citricultor deseaba realizar un cambio en la variedad.

Recolección de muestras y detección de CTV. Parcelas ubicadas en la zona central fueron muestreadas durante los períodos de otoño y primavera, mientras que las parcelas ubicadas en la zona de Pica y Matilla (I Región), debido a la presencia de altas temperaturas en otoño y primavera fueron muestreadas preferentemente en invierno. Cada árbol era considerado en forma independiente. Por cada muestra se obtuvieron cuatro brotes (obtenidos desde los puntos cardinales), mantenidos en contenedores enfriados con hielo, y enviados rápidamente al laboratorio para la realización de inmunoimpresión-ELISA. La técnica Inmunoimpresión-ELISA fue desarrollada de acuerdo a lo descrito por Cambra *et al.* (2000b), empleándose el procedimiento descrito en el estuche comercial (PlantPrint Diagnostics).

Análisis espacial. Con el propósito de determinar el efecto de la distancia de árboles infectados sobre el riesgo de infección de árboles no infectados, en la parcela ubicada en Matilla (I Región), se comparó el porcentaje de infección en 2002 del conjunto de árboles que no presentaba árboles infectados entre las cuatro posiciones contiguas (Grupo 1) respecto del conjunto que si presentaba árboles infectados en alguna de las cuatro posiciones contiguas (Grupo 2). De un total de 400 árboles, existían 83 infectados y 317 no infectados. El Grupo 1 constó de 200 árboles y el Grupo 2 de 117. Se calculó el valor del contraste (I) y su correspondiente valor de p. Se considera que el contraste es significativo y en consecuencia el efecto de la distancia existe cuando $p \leq 0.05$. Los

análisis fueron efectuados en el Departamento de Estadística e investigación operativa de la Universitat de Valencia – Estudi General, por el doctor Antonio López Quílez.

Análisis temporal. Este análisis se realizó graficando la presencia de árboles positivos y negativos a CTV, determinados mediante IPP-ELISA, de todas las parcelas experimentales mencionadas en el párrafo anterior. En aquellos sectores donde no había árbol o el lugar estaba ocupado por otra especie (huertos mixtos), se colocó una cruz. Para cada una de estas parcelas se calculó el porcentaje de incidencia de árboles infectados en relación al total de árboles evaluados.

Muestreo-prospección de pulgones. Se muestrearon especies de pulgones durante el otoño y primavera, por espacio de tres años, 2003-2005, en tres huertos de la zona central de Chile. Un huerto ubicado en Ovalle, IV Región, con limoneros cv. Eureka injertados sobre *C. macrophylla*; otro en Limache, V Región, y otro en Paine, Región Metropolitana. Estos últimos con árboles de naranjo dulce injertados sobre citrange Carrizo. En estas parcelas, se empleó el método de brotes pegajosos, según una metodología similar a la descrita por Cambra *et al.* (2000a) y Marroquín *et al.* (2004). Tres brotes de un total de cinco árboles (15 brotes en total) fueron asperjados con goma para atrapar insectos (Souverode, Rhône Poulenc). Los brotes fueron recolectados cada diez días asperjándose 15 nuevos brotes, por un período de tres meses durante el otoño y primavera, y por tres años consecutivos. Los brotes recolectados se introdujeron en un frasco con trementina, con el propósito de liberar las especies de insectos adheridas, se realizó un lavado con agua jabonosa para eliminar el disolvente, conservándose los especímenes obtenidos en alcohol etílico del 70%. Los pulgones fueron separados del resto de los insectos y clasificados mediante claves entomológicas (A. Hermoso de Mendoza, comunicación personal, 2004)

Detección de CTV en pulgones. Los pulgones capturados durante el año 2003, y conservados en alcohol fueron utilizados para ensayar la detección de dianas de CTV mediante RT-PCR anidado de acuerdo a la metodología desarrollada por Olmos *et al.*, (1999), y por RT-PCR a tiempo real según Olmos *et al.* (2005) utilizando las sondas previamente citadas (Bertolini *et al.*, 2008, en prensa). Los pulgones conservados en alcohol, de las especies de interés, se escacharon individualmente en papel filtro Whatmann 3M con ayuda de la parte basal de los tubos estériles. El RNA viral fue extraído mediante Triton-X-100. Se emplearon los siguientes iniciadores: Pin1 y Pin2 de acuerdo a Olmos *et al.* (1999) y OEPP/EPPO (2004) y para RT-PCR a tiempo real los iniciadores

descritos en el apartado 3.4.2. Como control negativo se empleó material libre de virus, mientras que como control positivo se emplearon brotes infectados con CTV. En ambos casos el material de cítrico fue impreso en papel. Durante el año 2004, la detección de pulgones virulíferos se realizó exclusivamente mediante la técnica de RT-PCR cuantitativa a tiempo real según Bertolini *et al.* (2008).

3.5.3 Resultados y Discusión

3.5.3.1 Ensayos de transmisión

Los resultados obtenidos en los dos ensayos de transmisión experimental indican una eficacia baja de *A. gossypii* en transmitir aislados chilenos de CTV. En el primer ensayo no fue posible transmitir ninguno de los aislados utilizados. En este ensayo se emplearon un total de 50 pulgones para efectuar la transmisión. Por otro lado, en el segundo ensayo de transmisión, se realizó mediante el uso de yemas infectadas con los aislados de CTV y mediante el uso de 200 pulgones por planta donante, traspasándose en promedio unos 100 pulgones a la planta receptora. La especie *A. gossypii* sólo fue capaz de transmitir el aislado 42-4, con una eficiencia de transmisión del 20%. Igual que en el otro ensayo, el resto de los aislados no fue posible transmitirlos experimentalmente de acuerdo a la metodología empleada.

El aislado transmitido fue obtenido del oasis de Pica (I Región de Chile), y fue colectado de un árbol de pomelo, con síntomas de acanaladuras en la madera (Figuras 3.3A y 3.B). Por otro lado, la metodología empleada en el segundo ensayo resultó en una transmisión eficaz, probablemente debido a que en este caso se empleó un mayor número de pulgones por planta donante. La no transmisión del resto de los aislados, en especial los pertenecientes a la zona central de Chile, puede explicar en alguna medida la baja dispersión de CTV observada en esta zona. En efecto, CTV fue detectado por primera vez en la zona en la década de 1960 (Weathers *et al.*, 1969), y durante la realización de esta tesis (véase apartado 3.1). La incidencia media de CTV estimada para esta zona fue muy baja (0,12%).

En ensayos efectuados por diversos autores, la eficiencia de transmisión por un solo pulgón osciló entre 0-1,9%, de este modo la eficiencia en la I Región (Chile) fue más baja de lo normal (0,2%, 20/100 pulgones), y puede ser comparada con la eficiencia de transmisión obtenida por Hermoso de Mendoza *et al.*, (1988a) al transmitir un aislado severo (T-388) de CTV mediante la especie *A. gossypii*.

El hecho de que los aislados de CTV colectados en la zona central de Chile no fueron transmitidos en ninguno de los dos ensayos, puede indicar que todavía existe un período de latencia, como hipotizó Bar-Joseph (1988). Esto debido posiblemente a la presencia mayoritaria de aislados no-transmisibles, que pueden inhibir la multiplicación y por ende

transmisión de aislados agresivos. Sin embargo, los aislados 305-2, 305-3 y 369, fueron colectados de fincas, en donde se realizaron estudios epidemiológicos y que demostraron que CTV se dispersaba, aunque a bajas tasas (Figura 3.6). Además, pruebas moleculares determinaron la presencia de pulgones virulíferos en estos predios indicando que los pulgones portaban dianas de CTV amplificables por RT-PCR, que sin duda, habían adquirido de árboles infectados por CTV (Cuadro 3.10).

Es importante resaltar que el aislado transmitido fue detectado en plantas receptoras de lima mejicana, esto puede indicar que este tipo de hospedero es más susceptible frente a la infección natural en Chile. Esto puede estar correlacionado al hecho de que en los oasis de Pica y Matilla (I Región), uno de los mayores porcentajes de infecciones naturales, fue encontrado en plantas de lima mejicana que producen los llamados "limones de Pica" (Cuadro 3.2).

3.5.3.2 Análisis espacio-temporal

De acuerdo a la evolución de la incidencia de CTV en los predios de Pica (I Región) (1y2) (Figuras 3.5 y 3.7) y Matilla (Figura 3.5 y 3.7), se observa que desde que se inició este estudio se encontraban con altos niveles de infección de CTV, con incidencias variables para la primera fecha de evaluación entre 21% para Matilla (I Región) y un 59,1% Pica 1 (I Región). A partir de esta fecha de muestreo, la incidencia se duplicó al año siguiente alcanzando niveles de infección superiores al 95% en las evaluaciones efectuadas en julio del año 2004 para los dos predios ubicados en Pica (I Región). En la zona central de Chile, la situación es distinta partiendo los tres predios con incidencias de: 1,78% para la parcela de limoneros ubicada en Ovalle, IV Región, (Figuras 3.6 y 3.7); 1,67% para la parcela ubicada en un huerto localizado en Limache, V Región, y de un 4% para la parcela en Paine, Región Metropolitana (Figuras 3.6 y 3.7), las últimas con árboles de naranjo dulce injertados sobre citrange Troyer.

En el predio ubicado en Ovalle (IV Región) (Figuras 3.6 y 3.7), muy probablemente debido a que corresponde a un huerto de limonero cv. Eureka injertado sobre *C. macrophylla*, no se observó diseminación de CTV a través del tiempo, a pesar de la existencia de especies vectoras como *A. gossypii* y *A. spiraecola*, y de la detección de individuos de CTV-virulíferos de la especie *A. gossypii*. Una situación similar fue reportada por Cambra *et al.* (2000a), a través de prospecciones efectuadas a árboles de limonero presentes en

la colección de germoplasma del IVIA ubicada en Moncada, Valencia, España, ya que tras cuatro años de muestreo ningún limonero se infectó, a pesar de la alta incidencia de CTV en parcelas vecinas.

En el estudio efectuado empleando la técnica del brote pegajoso (Marroquín *et al.*, 2004), en tres regiones diferentes (IV, V y Región Metropolitana), se observa que las especies de pulgones vectoras de CTV presentes en Chile, fueron detectadas en estas tres localidades (Cuadro 3.10). Otras especies de pulgones, también detectadas mediante la técnica de brote pegajoso en estos tres predios fueron: *A. craccivora*, *A. fabae*, *Myzus persicae* y *Macrosiphum euphorbiae*, todas ellas descritas en Chile previamente por Prado (1991).

Al analizar la presencia de pulgones capturados mediante la técnica del brote pegajoso (Cuadro 3.10), se desprende que la incidencia de pulgones en los tres predios de la zona central de Chile fue entre 50 y 100 veces más baja que la incidencia de pulgones detectada por Marroquín *et al.* (2004) en Valencia, España. La relativa baja incidencia de pulgones en la mayoría de los predios de Chile podría ser debida al escaso uso de pesticidas para el control de plagas, y por tanto, a un control biológico natural ejercido por enemigos naturales bien establecidos. Por otro lado, durante los años de muestreo no se produjeron heladas intensas que pudieran haber incentivado una brotación abundante de los árboles durante el período de otoño o primavera. La baja presencia de pulgones y su baja eficacia en la transmisión experimental, es concordante con la baja incidencia y dispersión de CTV en las principales zonas cítricas chilenas (III a VI Región).

Debido a la baja incidencia de CTV observada en predios de la zona central de Chile (parcelas experimentales de Ovalle, Limache y Paine (Figuras 3.6 y 3.7)), como a la alta incidencia de CTV observada en el oasis de Pica (Pica 1 y 2, Figuras 3.5 y 3.7) sólo fue posible realizar un análisis espacio-temporal en la parcela de Matilla (I Región), la que se encontraba con una incidencia media de CTV. En esta parcela, al realizar una comparación de la incidencia entre los años 2001 al 2002, se observó que de 200 árboles que no tienen en las cuatro posibles posiciones contiguas algún árbol vecino infectado, 45 se infectaron, lo que supone un porcentaje de infección del 22,4%. Por el contrario, de 117 árboles que presentan al menos un árbol infectado en las posiciones colindantes, 50 se infectan, lo que supone un porcentaje de infección de un 42,74%. Del análisis de proporciones efectuado, se obtiene que los árboles que poseen al menos un árbol

vecino infectado (Grupo 2, veáse apartado 3.5.2.2), es significativamente superior al Grupo 1 que no posee árbol infectado colindante (valor estadístico, $t = -3,71$; $p = 0.000$), por lo tanto, se deduce que los árboles afectados inciden en la infección del año siguiente.

Una situación similar ocurrió entre los años 2002 al 2003, sólo que el porcentaje de infección incremental fue de 10,1% (Grupo 2) y 4,35% (Grupo 1), respectivamente (valor estadístico, $t = -1,66$; $p = 0,048$). Esto se puede explicar en parte, considerando que durante el período entre los años 2002-2003, debido a un bajo rendimiento del predio en general que no permitía financiar el alto costo del agua en este Oasis, se dejó de regar. Esto debió influir en el número de brotes suculentos, y por lo tanto, una posible menor incidencia de pulgones, lo que está en directa relación con la dispersión de CTV (Marroquín et al., 2004).

Cuadro 3.10. Número de individuos de *Aphis gossypii* y *A. spiraeicola* capturados mediante el método del brote pegajoso durante otoño y primavera entre los años 2003 al 2005, y número de individuos CTV positivos, detectados mediante RT-PCR anidada en un solo tubo y RT-PCR a tiempo real.

Localidad, Región (variedad/portainjerto)	2003		2004		2005	
	Número ^a (Ag+As+Ta)	Positivo/total ^b	Número ^a (Ag+As+Ta)	Positivo/total ^b	Número ^a (Ag+As+Ta)	Positivo/total ^b
Ovalle, IV Región (limonero cv. Eureka /C. macrophylla) NR	Otoño	--	Otoño	Ag: 1/9 As: 0/7	Otoño	--
	Primavera	0	Primavera	Ag: 5/19 As: 0/7	Primavera	24
NR		As:-				As:
Limache, V Región (Naranja dulce/ Citrange troyer) NR	Otoño	--	Otoño	Ag: 0/3 As: 0/2	Otoño	--
	Primavera	6	Primavera	Ag: 5/15	Primavera	10
NR		As: 0/1		As: 0/39 Ag: 2/8 As: 0/7	Otoño	--
Paine, Región Metropolitana (Naranja dulce/ NR Citrange troyer) NR	Primavera	12	Primavera ^c	--	Primavera	Ag: As:

^aNúmero total de pulgones de especies consideradas vectoras de CTV presentes en Chile, detectadas durante otoño y/o primavera, y capturadas cada 10 días, asperjándose previamente 15 brotes (método del brote pegajoso) por parcela. Ag: *Aphis gossypii*; As: *A. spiraeicola* y Ta: *Toxoptera aurantii*.

^bNúmero de pulgones CTV positivos detectados por PCR, en relación al total de los analizados. Sólo *A. gossypii* y *A. spiraeicola* fueron analizados.

^c en 2003 mediante RT-PCR anidada en un solo tubo cerrado y en 2004 y 2005 por RT-PCR a tiempo real.

NR= No realizado.



FIGURA 3.4. A. Vista parcial del oasis de Pica (I Región), en donde se aprecia la aridez del desierto que la rodea. B. Brote de cítrico altamente atacado por mosquita blanca. C. Planta de naranjo dulce en proceso transmisión por pulgones desde brote de algodón. A la derecha planta receptora. D. Brote de naranjo dulce, con presencia de pulgones luego de 24 horas de alimentación (adquisición). E. Planta donante de lima mejicana injertada sobre citrange Troyer con síntomas de acucharamiento de hojas, y a su lado derecho plantas receptoras.

CUADRO 3.11. Aislados chilenos de CTV empleados en ensayos de transmisión mediante el uso de *Aphis gossypii* como vector.

Aislado de CTV	Lugar de origen	Especie	Síntomas		Serogrupo	Reacción a MCA13
			SP*,pomelo	SY**,N. agrío		
231-1 ^a	Azapa, I Región	Naranja dulce	Negativo	Positivo	1	Positivo
42-4 ^{a,b}	Pica, I Región	Pomelo	Positivo	Positivo	1	Positivo
509 ^{a,b}	Pica, I Región	Pomelo	Positivo	Negativo	1	Positivo
240-1 ^{a,b}	Matilla, I Región	Naranja dulce	Negativo	Positivo	1	Positivo
301-10 ^a	Pica, I Región	Lima mejicana	Negativo	Negativo	8	Negativo
281-1 ^{a,b}	Vallenar III Región	Naranja dulce	Negativo	Negativo	5	Negativo
496 ^{a,b}	Ovalle, IV Región	Limonero	Negativo	Negativo	6	Negativo
497 ^{a,b}	Ovalle, IV Región	Limonero	Positivo	Positivo	3	Positivo
305-2 ^b	Limache V Region	Naranja dulce	Negativo	Positivo	8	Negativo
305-3 ^a	Limache V Región	Naranja dulce	Negativo	Negativo	2	Negativo
369 ^{a,b}	Paine, Región Metrop.	Naranja dulce	Negativo	Positivo	2	Negativo
491 ^b	Perailillo, VI Región	Limonero	Negativo	Negativo	7	Negativo

^a Aislados empleados en el primer ensayo de transmisión.

^b Aislados empleados en el segundo ensayo de transmisión.

*SP, Acanaladuras en la madera o "stem pitting" en pomelo.

**SY, Amarillez de plántulas en naranja amargo de semilla.

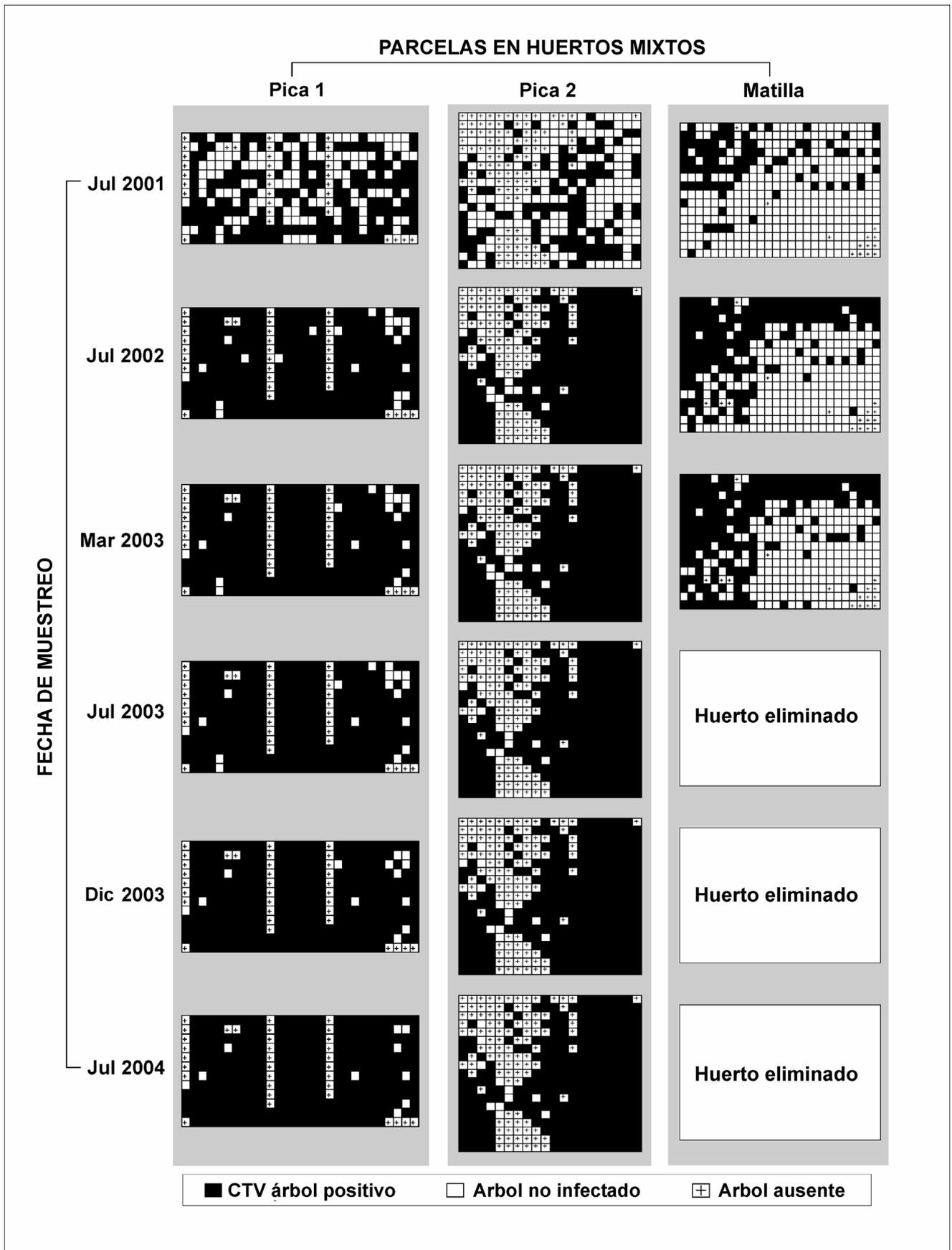


Figura 3.5. Parcelas 1, 2 y 3 ubicadas en huertos mixtos de cítricos y localizadas los oasis de Pica y Matilla, I Región de Chile, en donde se observa la evolución espacio-temporal de los árboles infectados con CTV.

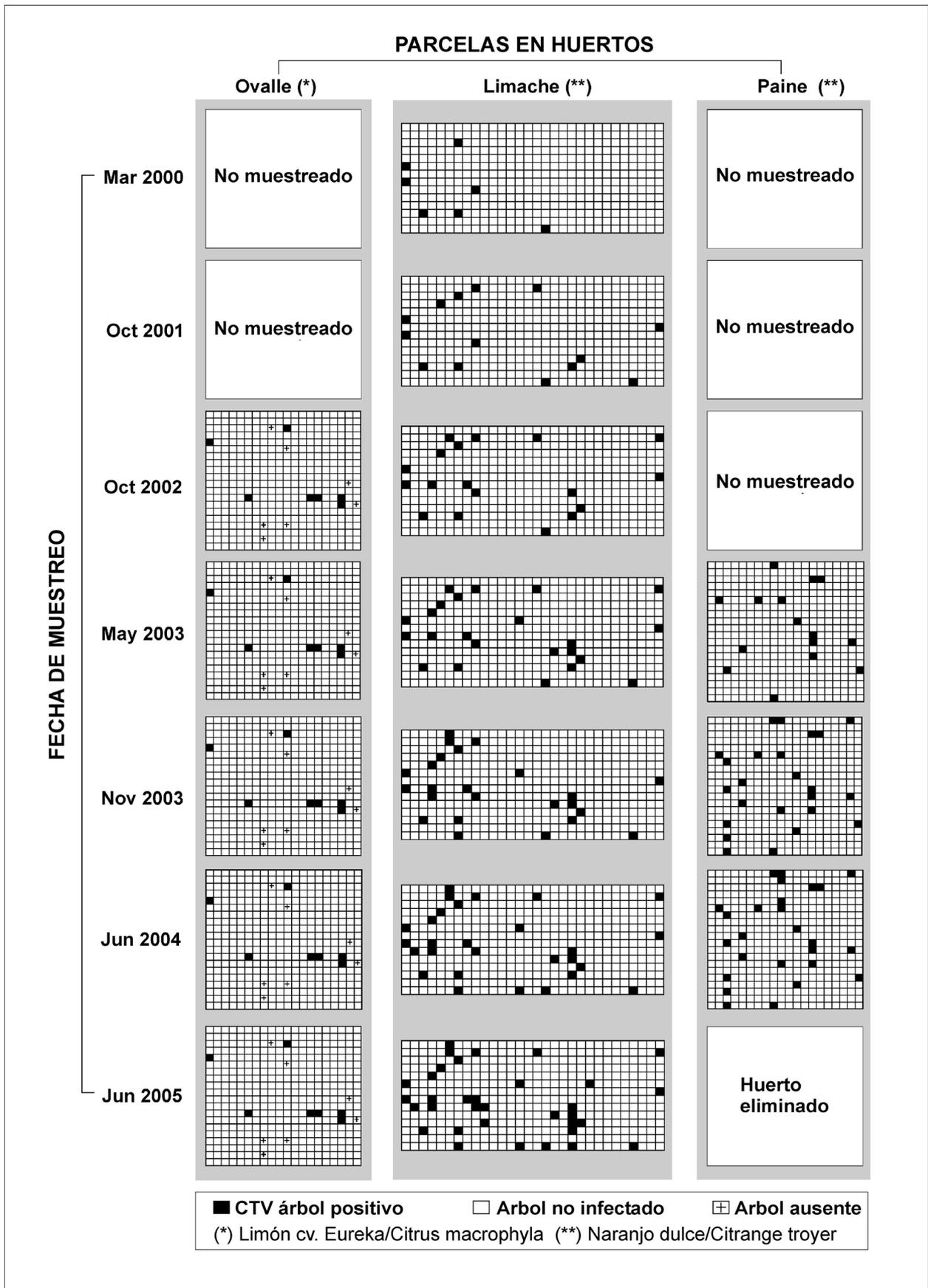


Figura 3.6. Parcelas ubicadas en 3 huertos de cítricos localizados en la zona central de Chile, donde se observa la evolución espacio-temporal de los árboles infectados con CTV.

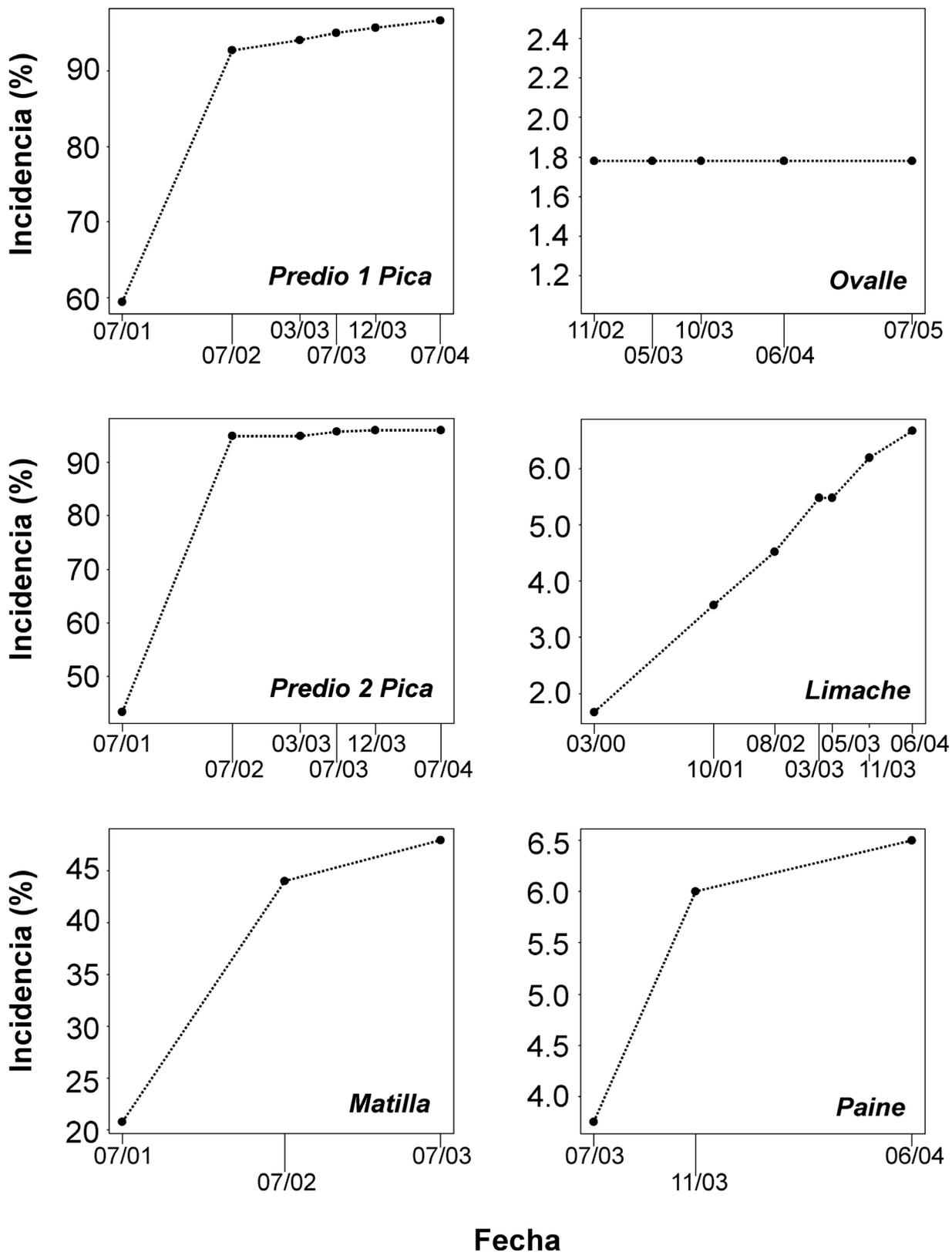


Figura 3.7. Evolución temporal (2000-2005) del porcentaje de incidencia de CTV, en seis parcelas experimentales localizadas en la I Región (Predio 1 y 2 de Pica) y en la zona central (Ovalle, Limache y Paine) de Chile.

4. Discusión General

La incidencia del virus de la tristeza en Chile, tras el análisis del 1% de los árboles (90.267) se puede considerar aún baja, ya que únicamente resultaron CTV positivos el 0.38% (Cuadros 3.2 y 3.3). Una situación distinta ocurre en los oasis de Pica y Matilla, I Región, con una incidencia media del 15,3%. La superficie total cultivada es de 277 ha, y está constituida por alrededor de 40 fincas cuyas superficies oscilan entre 0,5 y 52 ha, aunque sólo cuatro de éstas presentan una superficie superior a 10 ha. Esta zona se encuentra completamente aislada de la zona central de Chile (véase Figura 3.1).

De acuerdo a los resultados obtenidos en la caracterización biológica, serológica y molecular, los aislados agresivos detectados en Chile corresponderían a aislados provenientes de la I Región, que además de presentar síntomas en las plantas indicadoras de acanaladuras en pomelo y/o naranjo dulce, mostraron SY y/o fueron capaces de causar DI en naranjo agrio sobre dulce. Estos aislados reaccionaron positivamente con MCA 13 y a su vez presentaron secuencias correspondientes al aislado tipo VT. La mayoría de estos aislados se agruparon en los grupos biológicos 7 y 13 (Cuadro 3.12). En esta región a su vez, se detectó la presencia en campo de síntomas típicos de aislados agresivos (acanaladuras en la madera o "stem pitting" en pomelo) (Figura 3.2 A y C). La mayoría de los aislados (85%) procedentes de esta zona, se obtuvo simultáneamente una reacción positiva frente al anticuerpo monoclonal MCA 13 desarrollado por Permar *et al.* (1991) y amplificación positiva por alguno de los iniciadores del aislado tipo VT. La totalidad de aislados de CTV de esta zona dieron al menos una de estas dos reacciones. El 73,3% de los aislados de la zona indujeron reacción DI según Pina *et al.* (2004) (Cuadro 3.5).

El hecho de haber caracterizado a la mayoría (90%) de los aislados procedentes de la zona central de Chile como suaves o poco agresivos, podría explicar la ausencia de decaimientos en huertos antiguos de naranjo dulce injertados sobre naranjo amargo. Sin embargo, un 50% de éstos dieron una reacción DI de acuerdo a lo propuesto por Pina *et al.*, (2004). Sin embargo, es importante señalar, que la mayoría de los huertos presentes en la zona central de Chile, están sobre portainjerto tolerante. También puede haber contribuido a la no dispersión de CTV a huertos antiguos con naranjo agrio como portainjerto, la baja transmisión de CTV observada en huertos provenientes de la zona central (Figura 3.6 y 3.7), o incluso la nula transmisión de seis aislados de CTV provenientes de la zona central (Cuadro 3.11), obtenida tras dos ensayos de transmisión efectuados, incluso a pesar de emplearse hasta 100 pulgones por planta receptora. A su vez, el 90%

de los aislados procedentes de esta zona (los mismos clasificados como suaves) fueron MCA13 negativos y no amplificaron ninguna banda asociada al aislado VT.

Con relación al análisis serológico efectuado, la combinación 3DF1 y 3CA5 fue capaz de reconocer todos los aislados chilenos de CTV, lo que concuerda con lo previamente descrito por Cambra *et al.* (1990 y 1993). Por otro lado, los anticuerpos monoclonales: α CTV4E5-a1 y α CTV4B1-3 de Marruecos y 3BH6 de España, también fueron capaces de reconocer todos los aislados chilenos analizados.

Los iniciadores universales Pin 1 y Pin 2 descritos en el protocolo de la OEPP/EPPO (2004) para el diagnóstico de aislados de CTV, fueron capaces de reconocer el 100% de los aislados chilenos estudiados, al igual que lo hicieron los marcadores universales de la cubierta proteica del aislado T36 (Hilf y Garnsey, 2000) y los diseñados por Bertolini *et al.* (2008) para PCR a tiempo real.

En el Cuadro 3.13 se muestra, a modo de resumen, una agrupación de los 100 aislados chilenos de CTV seleccionados, en función de sus características biológicas, serológicas y moleculares estudiadas. De 47 aislados de CTV de la I Región (los cinco primeros grupos del Cuadro 3.13), 45 reaccionaron con MCA13, fueron catalogados como tipo VT y todos excepto uno de pomelo, provocaron síntomas destacables en plantas indicadoras (DI amargo/dulce, SY o SP). Esta buena correlación indica que para clasificar aislados de CTV debe efectuarse una aproximación integral (biológica, serológica y molecular). No obstante, también se han encontrado aislados considerados agresivos en pruebas biológicas experimentales que no mostraban síntomas en las plantas de campo de origen, ni en posteriores viajes hasta 2006, a los oasis de Pica y Matilla en la I Región, a pesar de mostrar algunos de ellos reacción MCA13 positiva. Es el caso de los aislados: 301-34, 301-34B y 301-44B (véase Cuadro 3.8).

De dos ensayos de transmisión de CTV mediante pulgones, sólo se logró transmitir el aislado 42-4 en el segundo ensayo de transmisión. Este aislado fue originalmente obtenido desde un árbol de pomelo con síntomas de acanaladuras en la madera, y fue considerado como aislado agresivo de acuerdo a la caracterización biológica (Cuadro 3.5). Sin embargo, otros seis aislados considerados como agresivos no lograron ser transmitidos. Es interesante notar que trabajos realizados por Kano *et al.* (1991) obtuvieron transmisión de todos los aislados agresivos de CTV, pero algunos de los aislados suaves no fueron transmitidos. De hecho Dickson (1951) reporta una baja eficiencia de transmisión

de CTV por *A. gossypii* con aislados obtenidos directamente de árboles infectados, mientras que se produce un aumento de eficiencia de transmisión con aislados de tipo SY. Una situación similar se ha descrito en Israel (Roistacher y Moreno, 1991). Sin embargo, Hermoso de Mendoza *et al.*, (1988a), observaron lo contrario, una eficiencia de transmisión de un 28% para el aislado agresivo T-308 y un 78% de eficiencia para el aislado suave T-300.

La conocida complejidad de CTV en sus manifestaciones también se ha mostrado en Chile, a pesar de no parecer mayoritarias las mezclas de aislados, al menos con los análisis efectuados. La mayoría de los aislados chilenos (33%) (véase Cuadro 3.14) se incluyeron en el grupo biológico 7 (capaces de causar DI amargo/dulce), se agruparon en diferentes serogrupos (hasta cinco) sugiriendo diversidad serológica y fueron genotipados por RT-PCR como pertenecientes a cuatro grupos (aunque mayoritariamente al VT), indicando también variabilidad.

El segundo grupo de aislados de CTV de relativa frecuencia (20% en el Cuadro 3.14) en Chile, se catalogaron como típicos del grupo biológico 13 ya que únicamente indujeron síntomas en lima mejicana. No obstante, algunos reaccionaron frente a MCA13 y su perfil molecular se agrupó como VT, T30 + VT ó sólo CPT36, denotando todo ello variabilidad. Ninguno de estos aislados proporcionó en campo síntomas de importancia en sus hospedadores originales (Cuadro 3.12). Esto reafirma la conveniencia de realizar una caracterización no sólo biológica de los aislados como lo sugieren Garnsey *et al.* (1987b), sino también serológica y molecular.

El tercer grupo de relativa frecuencia en Chile (18% de los aislados de CTV estudiados) también mostró variabilidad al pertenecer a los serogrupos 1 ó 2 y agruparse según RT-PCR con T30, VT y VT + T30. Estos aislados se agruparon dentro del grupo biológico 4 (indujeron DI amargo/dulce y SY en naranjo amargo). No obstante, tampoco en campo se observaron síntomas significativos en sus hospedadores originales (Cuadro 3.12).

Por tanto en la zona central de Chile, en donde se ubican los predios con importancia económica, son mayoritarios los aislados poco agresivos, que no inducen por el momento síntomas de decaimiento en campo, ni acanaladuras en la madera de pomelos y/o naranjos dulces, y que parecen poco transmisibles naturalmente por las especies de pulgones presentes en Chile.

Cuadro 3.12. Clasificación general de 100 aislados chilenos de CTV, considerando lugar de origen, especie hospedante, caracterización biológica, serológica y molecular, esta última por RT-PCR utilizando 11 pares de iniciadores diferentes (Hilf *et al.*, 2005).

Región	Localidad	Hospedador/ Síntoma en campo	Aislado	Grupo biológico	Grupo serológico	MCA 13	Caracterización Molecular*
Tercera	Vallenar	Naranja dulce	281-1	7	5	Neg	VT-VTPol+T30Pol
Primera	Comiña	Naranja dulce	101-3	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Matilla	Pomelo	179-1	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	96-5	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Pomelo/SP	42-4	12	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Pomelo/SP	92-2	12	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Pomelo/SP	511	4	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	95-5	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	95-6	13	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	106-5	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Naranja dulce	89-2	7	1	Pos	VT-VTPol
Primera	Pica	Naranja dulce	88-2	3	1	Neg	VT-VTPol
Primera	Pica	Pomelo	42-3	13	4	Pos	VT-VTPol
Primera	Matilla	Naranja	240-1	4	1	Pos	VT-VT5'
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	327	4	1	Pos	VT-VT5'
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	521	4	1	Pos	VT-VT5'
Primera	Pica	Naranja dulce	524	2	1	Pos	VT-VT5'
Primera	Pica	Naranja dulce	337	7	3	Pos	VT-VT5'
Primera	Pica	Pomelo/SP	510	12	1	Pos	VTK17
Primera	Pica	Pomelo/SP	514	4	1	Pos	VT5'
Primera	Azapa	Naranja dulce	232-2	4	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Azapa	Naranja dulce	231-1	ND	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	301-21	7	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	84-1	4	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	83-3	4	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Pica	Naranja dulce	87-5	4	1	Pos	VT+T30K17
Primera	Comiña	Naranja dulce	101-2	7	1	Pos	VT
Primera	Comiña	Naranja dulce	101-4	7	1	Pos	VT
Primera	Comiña	Naranja dulce	101-5	4	1	Pos	VT
Primera	Comiña	Naranja dulce	101-6	7	1	Pos	VT
Primera	Comiña	Naranja dulce	301-34	5'	1	Pos	VT
Primera	Comiña	Naranja dulce	301-34B	ND	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	96-3	4	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	96-1	7	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	301-7	7	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	301-25B	13	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	301-30B	13	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Lima mejicana/VC	96-6	5	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Naranja dulce	244-1	4	1	Pos	VT
Primera	Matilla	Tangelo	246-2	7	1	Pos	VT
Primera	Pica	Pomelo/SP	508	5'	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-2	4	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-6	4	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	95-3	7	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	106-3	7	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	106-4	4	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	85-1	4	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-5	ND	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-9	13	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-11	13	1	Pos	VT
Primera	Pica	Naranja dulce	301-41B	4	1	Pos	VT
Primera	Pica	Naranja dulce	301-44B	2	1	Pos	VT

Primera	Pica	Naranja dulce	334	3	1	Pos	VT
Primera	Pica	Lima mejicana/VC	301-10	10	8	Neg	VT
Sexta	Lolol	Naranja dulce	490	7	2	Neg	T30Pol
Sexta	Perailillo	Limonero	491	13	7	Neg	T30Pol
Sexta	Nancagua	Naranja dulce	462	7	2	Neg	T30K17+T30Pol
Sexta	Nancagua	Naranja dulce	464	7	2	Neg	T30K17+T30Pol
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-1	7	1	Pos	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-1B	13	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-8B	13	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-15B	7	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-3	13	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-7	7	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-8	ND	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-14	7	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-16	ND	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-5B	4	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-6B	10	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-4	13	2	Neg	T30K17
Metrop	Buin	Limonero	366	13	2	Neg	T30K17
Metrop	Melipilla	Naranja dulce	351	13	2	Neg	T30K17
Metrop	Melipilla	Naranja dulce	349	7	2	Neg	T30K17
Metrop	Paine	Naranja dulce	368	13	2	Neg	T30K17
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-2	13	8	Neg	T30K17
Primera	Pica	Pomelo/SP	509	5	1	Pos	Sólo T36CP**
Primera	Pica	Pomelo/SP	507	5	1	Pos	Sólo T36CP
Primera	Pica	Pomelo	512	10	1	Pos	Sólo T36CP
Primera	Pica	Pomelo/SP	516	10	1	Pos	Sólo T36CP
Primera	Pica	Pomelo/SP	517	10	1	Pos	Sólo T36CP
Primera	Ovalle	Limonero	495	ND	1	Pos	Sólo T36CP
Primera	Pica	Pomelo/SP	525	7	1	Pos	Sólo T36CP
Tercera	Vallenar	Naranja dulce	502	13	2	Neg	Sólo T36CP
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-11	13	2	Neg	Sólo T36CP
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-12	ND	2	Neg	Sólo T36CP
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-18	7	2	Neg	Sólo T36CP
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-19	ND	2	Neg	Sólo T36CP
Quinta	Limache	Naranja dulce	305-19B	7	2	Neg	Sólo T36CP
Metrop	Paine	Naranja dulce	369	13	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Doñihue	Naranja dulce	492	7	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	L. Cabras	Naranja dulce	467	7	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Nancagua	Naranja dulce	461	7	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Nancagua	Naranja dulce	463	7	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Peumo	Naranja dulce	389	7	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Peumo	Naranja dulce	503	ND	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Peumo	Naranja dulce	504	ND	2	Neg	Sólo T36CP
Sexta	Sta, Cruz	Naranja dulce	460	13	2	Neg	Sólo T36CP
Cuarta	Ovalle	Limonero/SP***	494	5	3	Pos	Sólo T36CP
Cuarta	Ovalle	Limonero/SP***	497	9	3	Pos	Sólo T36CP
Cuarta	Ovalle	Limonero/SP***	496	13	6	Neg	Sólo T36CP

Pos, Reacción positiva a AMC13 (Permar *et al.*, 1990); Neg, Reacción negativa a AMC13; ND, No determinado.
VC, Aclareamiento de venas en campo; SP, Acanaladuras en la madera.

* Las siglas expresan el sector amplificado (VT (completo), VT5', T30Pol, T30K17) y (-) ausencia de amplificación.

** Indica que sólo se amplificó la secuencia conservada que reconoce todos los aislados de CTV.

***Síntoma de SP en portainjerto *C. macrophylla*.

CUADRO 3.13. Agrupación de 100 aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) de acuerdo a sus características biológicas, serológicas y moleculares. Cuadro resumen.

Región de origen	Especie de origen	Aislados chilenos de CTV (N°)	Grupo Biológico	Grupo Serológico	MCA13(+)	Síntomas en Invernadero*	Tipo de CTV
I	N. dulce, L. mejicana Pomelo y Tangelo	28	2, 3, 4, 5, 5', 7, 13 y NC	1 y 8	27	VC y SP en L. mejicana, SP y DI en N. dulce, SP y SY en Pomelo, SY en N. dulce	VT
I	N. dulce L. mejicana	12	3, 4, 7, 12 y 13	1 y 4	11	VC y SP en L. mejicana DI en N. dulce SY en N. dulce	VT (5' + K17)
I	Naranja y L. mejicana	5	2, 4 y 7	1 y 3	5	VC y SP en L. mejicana, DI en N. dulce SY en N. dulce	VT (K17 + Pol)
I	Pomelo	1	12	1	1	VC en L. mejicana	VT (K17)
I	Pomelo	1	4	1	1	VC, SP en L. mejicana, DI en N. dulce SY en N. amargo	VT (5')
I	N. dulce L. mejicana	6	4, 7 y NC	1	6	VC y SP en L. mejicana, DI en N. dulce, SY en Pomelo, SY en N. amargo	VT + T30(K17)
IV	N. dulce	1	7	5	0	VC y SP en L. mejicana DI en N. dulce	VT (5' + K17) + T30Pol
VI	N. dulce	2	7	2	0	VC en L. mejicana, DI en N. dulce, SY en Pomelo	T30 (K17) + T30(Pol)
VI	N. dulce Limónero	2	7 y 13	2 y 7	0	VC en LM, DI en ND, SY en PD	T30(Pol)
V, Metrop.	N. dulce Limónero	17	4, 7, 10, 13 y NC	1 y 2	1	VC y SP en LM, DI en ND SY en PD y SY en NA	T30 (K17)
I, III, IV, V, VI y Metropolitana	N. dulce	25	5, 7, 9, 10, 13 y NC	1, 2, 3 y 6	9	VC y SP en LM, DI en ND SP y SY en PD, SY en NA	Sólo CP36

VC= Aclareamiento de venas, SP=Acanaladuras de la madera, SY=amarillez de plantas, DI= decalimiento en ND/NA, ND= Naranja dulce, LM= Lima mejicana, NA= Naranja amargo, PD= Pomelo cv. Duncan, NC= No clasificada.

CUADRO 3.14. Resumen de los resultados obtenidos en la caracterización biológica de cien aislados chilenos del virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

Grupo(*) biológico	Lima mejicana	DI** naranja dulce/ naranja agrio*	SY en naranja agrio	SP en naranja dulce	SP en pomelo cv. Duncan	Grupo serológico	Aislados chilenos de CTV (%)	Genotipo PCR		Sólo CPT36
								T30	VT T30+VT	
01	+	+	+	+	+	0	0	0	0	0
02	+	+	+	+	-	1	2	2	0	0
03	+	+	+	-	+	1	2	2	0	0
04	+	+	+	-	-	1 y 2	18	13	4	0
05	+	+	-	-	+	1 y 3	4	1	0	3
05'	+	+	-	+	-	1	2	2	0	0
06	+	+	-	+	+	-	0	0	0	0
07	+	+	-	-	-	1, 2, 3, 5	33	15	2	8
08	+	-	+	+	+	-	0	0	0	0
09	+	-	+	-	+	1	3	0	0	1
10	+	-	+	-	-	1, 2 y 8	5	1	0	3
11	+	-	-	+	+	-	0	0	0	0
12	+	-	-	-	+	1	3	3	0	0
13	+	-	-	-	-	1, 2, 4, 6, 7	20	6	0	5
14	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0
ND							9	1	1	5
Total (%)	100	61	32	6	11		100	47	7	25

* Considerando la metodología para evaluar DI en Naranja dulce/ Naranja amargo propuesta por Pina et al. (2004).

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 CONCLUSIONES

- 1) Se determinó la presencia de CTV en Chile asociado a prácticamente todas las regiones citrícolas del país, a excepción de la VII Región. Sin embargo, la incidencia fue variable en estas regiones, determinándose el mayor porcentaje de árboles afectados en la I Región, específicamente asociados a los oasis de Pica y Matilla. El virus se detectó en todas las especies de cítricos cultivadas en el país. Se han descrito síntomas de acanaladuras de la madera en árboles de campo de pomelo, *Citrus macrophylla* (como portainjerto de variedades de pomelos y limonero) y en árboles formados a partir de semilla de la especie lima mejicana, conocida en Chile como limón de Pica. No se observaron ni acanaladuras en la madera de naranjo dulce ni el decaimiento de tristeza en árboles de plantaciones efectuadas sobre el patrón naranjo agrio.
- 2) Las especies de pulgones descritas como vectoras de CTV detectadas fueron: *Aphis gossypii*, *A. spiraecola* y *Toxoptera aurantii*. La especie *T. citricida* no fue detectada en ninguna de las regiones prospectadas, a pesar de estar presente en los países vecinos de Perú y Argentina.
- 3) En estudios espacio-temporales, fue posible observar como CTV aumentó su incidencia en prácticamente todas las parcelas evaluadas, a excepción de un huerto de limonero, en donde el virus fue incapaz de infectar plantas sanas a partir de inóculo presente en limoneros sistémicamente infectados. Estudios conducentes a evaluar la eficiencia de transmisión de aislados de CTV, en dos ensayos realizados, empleando 50 y 200 pulgones por planta donante, sólo fue posible transmitir un aislado de CTV (42-4 de Pica, positivo a reacción de "seedling yellows" en naranjo amargo y positivo a acanaladuras en la madera en pomelo) a dos plantas receptoras, ambas de lima mejicana. No se pudo transmitir experimentalmente ninguno de los aislados de CTV procedentes de la zona central de Chile.
- 4) La caracterización biológica, serológica y molecular, sugiere que la mayoría de los aislados pueden ser considerados suaves o poco agresivos, aunque se han detectado aislados severos ubicados principalmente en la I Región de Chile. En este estudio existió plena concordancia entre la ubicación geográfica de los aislados de CTV, la reacción serológica frente a MCA13 y el aislado-tipo molecular al que pertenecen. Es decir, los aislados originarios de la I Región de Chile fueron clasificados como MCA 13

positivos y VT. Además, estos aislados causaron síntomas de acanaladuras de la madera, tanto a nivel de campo como en pruebas biológicas. Esta es la primera cita que reporta la presencia de este tipo de aislados agresivos en Chile.

5.2 RECOMENDACIONES

Considerando lo expuesto anteriormente, se sugieren las siguientes recomendaciones y se efectúan los siguientes comentarios generales:

- Es importante el uso exclusivo de material certificado en Chile en nuevas plantaciones y en replantes. Se deben emplear variedades seleccionadas injertadas sobre patrones tolerantes al síndrome de la tristeza. Con ello se contribuiría a no aumentar la incidencia de CTV y a asegurar una citricultura moderna y con futuro.
- La presencia de aislados agresivos (I y IV regiones), capaces de causar el síndrome de acanaladuras en la madera en variedades de pomelo en campo y experimentalmente, o en naranjo dulce (experimentalmente), supone un riesgo para el resto de la citricultura chilena en caso de dispersarse. Por lo tanto, convendría su erradicación. Su presencia localizada en oasis facilitaría esta tarea. Si no se realiza erradicación, al menos la zona, debería ser sometida a cuarentena impidiendo legalmente la salida de material vegetal de estas zonas a otras o a nuevas plantaciones en el área.

El potencial cítrico de Chile se centra en la producción para mercado externo de fruta fresca: naranjas, mandarinas y limones de calidad destinados a mercados exigentes. También es importante la producción de limones de Pica (limas mejicanas), que alcanzan retornos considerables al ser comercializados hacia importantes centros urbanos ubicados en la zona central, donde se consumen en la conocida bebida "pisco sour". El potencial cítrico chileno se basa principalmente en la óptima situación sanitaria de Chile, caracterizada por la ausencia de especies de mosca de la fruta y de importantes enfermedades causadas por: bacterias ("cancrosis de los cítricos", "huanglonging"), fitoplasmas ("escobas de bruja", "stubborn"), virosis graves como "leprosis" y hongos causantes de enfermedades cuarentenarias ("mancha negra" y "sarna de los cítricos"). Esta situación sanitaria, junto con la ubicación de

Chile en el hemisferio sur, privilegian la exportación de fruta a: EE.UU., U.E. y Japón, sobre sus competidores en el mismo hemisferio.

Para mantener la potencialidad debe surgir una nueva citricultura chilena, basada en el empleo de cultivares seleccionados y libre de virus (plantas certificadas) injertados sobre patrones tolerantes al decaimiento por tristeza, que en la actualidad suponen únicamente un 30% de las plantaciones. Se debe aprovechar este momento en el que todavía no se ha manifestado la muerte de árboles injertados sobre naranjo amargo, para realizar la reconversión citrícola. La manifestación epidemiológica de CTV con decaimiento puede darse en cualquier momento, ya que CTV está presente en todas las regiones citrícolas importantes de Chile, tal y como ha puesto de manifiesto este estudio.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTINI, D., VOGEL, R., BOVÈ, C., BOVÈ, J.M. 1988. Transmission and Preliminary characterization of citrus tristeza strain K. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 17-21.
- ALBIACH-MARTÍ, M.R., MAWASSI, M., GOWDA, S., SATNARAYANA, T., HILF, M., SHANKER, S., ALMIRA, E.C., VIVES, M.C., LÓPEZ, C., GUERRI, J., FLORES, R., MORENO, P., GARNSEY, S.M., DAWSON, W.O. 2000a. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology* 74: 6856-6865.
- ALBIACH-MARTÍ, M.R., GUERRI, J., HERMOSO DE MENDOZA, A., LAIGRET, F., BALLESTER-OLMOS, J.F., MORENO, P. 2000b. Aphid transmission alters the genomic and defective RNA populations of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* 90: 134-138.
- ALBIACH-MARTI, M.R.; GROSSER, J.W.; GOWDA, S.; MAWASSI, M., SATYANARAYANA, T.; GARNSEY, S.M. DAWSON W.O. 2004. *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding* 14(2): 117-128.
- AVINENT, L., HERMOSO DE MENDOZA, A., LLÁCER, G. 1993. Comparison of sampling methods to evaluate aphid populations (Homoptera, Aphidinea) alighting on apricots trees. *Agronomie* 13, 609-613.
- BALLESTER-OLMOS, J.F., CARBONELL; E.A., MORENO, P., HERMOSO DE MENDOZA, A., CAMBRA, M., NAVARRO, L. 1993. Biological diversity spread of citrus tristeza virus (CTV) in Spain. *Plant Pathology* 42:219-229.
- BAR-JOSEPH, M. 1978. Cross protection incompleteness: a possible cause for natural spread of citrus tristeza virus after a prolonged lag period in Israel. *Phytopathology* 68: 1110-1111.
- 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., LOEBENSTEIN, G, OREN, Y. 1974. Use of electron microscopy in eradication of tristeza sources recently found in Israel. In: Weathers (ed.). Proceedings of the 6th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 83-85.
- BAR-JOSEPH, M., SACKS, J.M., GARNSEY, S.M. 1978. Detection and estimation of Citrus tristeza virus infection rates based on ELISA assays of packing house fruit samples. *Phytoparasitica* 6: 145-149.
- BAR-JOSEPH, M., GARNSEY, S.M., GONSALVES, D., MOSCOVITZ, M., PURCIFULL, D.E., CLARK, M.F., LOEBENSTEIN, G. 1979. The use of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 69: 190-194.
- BAR-JOSEPH, M., MARCUS, M.R., LEE, R.F. 1989. The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology* 27: 291-316.

- BAR-JOSEPH, M., CHE, X., MAWASSI, M., GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., AYLÓN, M., ALBIACH-MARTÍ, R., GARNSEY, S.M., DAWSON, W.O. 2002. The Continuous Challenge of *Citrus tristeza virus* molecular research. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 1-7.
- BATISTA, L., ROJAS, A., PORRAS, D.N., GUTIERREZ, A., RODRIGUEZ, I., ZAYAS, M., ESTRELLA, A., CAMBRA, M. 1994. Obtención de un anticuerpo monoclonal contra el virus de la tristeza de los cítricos. Memoria del III Simposium Internacional sobre sistemas de producción de cítricos. Universidad de Chapingo, México.
- BATUMAN, O., MAWASSI, M., BAR-JOSEPH, M. 2006. Transgenes consisting of a ds>RNA of an RNAi suppressor plus the 3' UTR provide resistance to *Citrus tristeza virus* sequences in *Nicotiana benthamiana* but not in *Citrus*. *Virus Genes* 33: 319-327.
- BERTOLINI, E., MORENO, A., CAPOTE, N., OLMOS, O., 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. *European Journal of Plant Pathology* (en prensa). DOI: 10.1007-s10658-007-9206-9.
- BESOAIN, X.A., VALENZUELA, M., CASTRO, M., BALLESTER-OLMOS, J.F. 2000. Situación actual de las enfermedades tipo virus que afectan a los cítricos en Chile. *Fitopatología* 35: 98-104.
- BERNET, G.P., BRETÓ, M.P., ASINS, M.J. 2004. Expressed sequence enrichment for candidate gene analysis of citrus tristeza virus resistance. *Theoretical Applied Genetics* 108: 592-602.
- BOVÉ, C., VOGEL, R., ALBERTINI, D., BOVÉ, J.M. 1988. Discovery of a strain of tristeza virus (K) inducing no symptoms in Mexican lime. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 14-16.
- BRLANSKY, R.H., GARNSEY, S.M., LEE, R.F., PURCIFULL, D.E. 1984. Application of citrus tristeza virus antisera for use in labeled antibody, immuno-electron microscopical and sodium dodecyl sulphate-immunodiffusion tests. In: NS.M. Garnsey, L.W. Timmer, J.A. Dodds (eds.). Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 337-342.
- BRLANSKY, R.H., PELOSI, P.R., GARNSEY, S.M., YOUTSEY, C.O., LEE, R.F., YOKOMI, R.K., SONODA, R.M. 1986. Tristeza quick decline epidemic in South Florida. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 99: 66-69.
- BRLANSKY, R.H., HOWD, D.S., BROADBENT, P., DAMSTEEGT, V.D. 2002. Histology of sweet orange stem pitting caused by an Australian isolate of *Citrus tristeza virus*. *Plant Disease* 86: 1169-1174.
- BRLANSKY, R.H., DAMSTEEGT, V.D., HOWD, D.S., ROY, A. 2003. Molecular analyses of *Citrus tristeza virus* subsisolates separated by aphid transmission. *Plant Disease* 87: 397-401.
- BROADBENT, P., BEVINGTON, K.B., COOTE, B.G. 1991. Control of stem pitting of grapefruits in Australia by mild strain protection. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 64-70.

- BROADBENT, P., BRLANSKY, R.H., INDSTO, J. 1996. Biological characterization of Australian isolates of citrus tristeza virus and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease* 80: 329-333.
- CALAVAN, E.C., MATHER, S.M., McEACHERN, E.H. 1978. Registration, Certification, and Indexing of Citrus Trees. In: *The Citrus Industry*. Volume IV. Pp: 185-222. W. Reuther, E.C. Calavan, G.E. Carman (eds.) University of California, Division of Agriculture Sciences, California, USA. 362 p.
- CAMBRA, M. 1983. Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica ELISA: interés y aplicaciones. *Levante Agrícola* 245: 11-17.
- CAMBRA, M., MORENO, P. 2000. Tristeza. Pags. 77-81. In: *Enfermedades de los cítricos*. P. Moreno, N. Durán-Vila (eds.). Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. Nº2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 213 pp.
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T. 2003. La tristeza de los cítricos en la cuenca del Mediterráneo. *Phytoma*: 42-48.
- CAMBRA, M., MORENO, P., NAVARRO, L. 1979. Detección rápida del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) mediante la técnica inmunoenzimática ELISA-Sandwich. *Anales INIA, Serie Protección Vegetal* 12: 115 – 125.
- CAMBRA, M., GARNSEY, S.M., PERMAR, T.A., HENDERSON, C.T., GUMPF, D., VELA, C. 1990. Detection of citrus tristeza virus (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology* 80: 1034.
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T., SERRA, J., CAMARASA, E., PINA, J.A., SANZ, A., VELA, C., LLATSER, F. 1991a. Diagnóstico y estudio del virus de la tristeza de los cítricos utilizando técnicas inmunoenzimáticas con anticuerpos monoclonales específicos. *Levante Agrícola*: 176-186.
- CAMBRA, M., CAMARASA, E., GORRIS, M.T., GARNSEY, S.M., CARBONELL, E. 1991b. Comparison of different immunosorbent assays for citrus tristeza virus (CTV) using CTV-specific monoclonal and policlonal antibodies. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). *Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*. 38-45.
- CAMBRA, M., CAMARASA, E., GORRIS, M.T., GARNSEY, S.M., GUMPF, D.J., TSAI, M.C. 1993. Epitope diversity of isolates of citrus tristeza virus (CTV) in Spain. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). *Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*. 33-38.
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T., MARROQUIN, C., ROMÁN, M., OLMOS, A., MARTÍNEZ, M., HERMOSO DE MENDOZA, A., LÓPEZ, A., NAVARRO, L. 2000a. Incidence and epidemiology of citrus tristeza virus in the Valencian Community of Spain. *Virus Research* 71: 85-95.
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T., ROMÁN, M.P. TERRADA, E., GARNSEY, S.M., CAMARASA, E., OLMOS, A., COLOMER, M. 2000b. Routine detection of citrus tristeza virus by direct immunoprinting-ELISA method using monoclonal and recombinant antibodies. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*. 34-41.

- CAMBRA, M., OLMOS, A., GORRIS, M.T., MARROQUÍN, C., ESTEBAN, O., GARNSEY, S.M., LLAUGER, R., BATISTA, L., PEÑA, I., HERMOSO DE MENDOZA, A. 2000c. Detection of citrus tristeza virus by print capture and squash capture-PCR in plant tissue and single aphids. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 42-49.
- CAMBRA, M., GORRIS, M.T., OLMOS, A., MARTÍNEZ, M.C., ROMÁN, M.P., BERTOLINI, E., LÓPEZ, A., CARBONELL, E.A. 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for Citrus tristeza virus in adult trees. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 69-77.
- CEVICK, B., PAPPU, S.S., PAPPU, H.R., BENSCHER, D., IREY, M., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 1996a. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: Detection and strain differentiation. In: J.V. da Graça, P. Moreno, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 13th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 17-23.
- CEVICK, B., PAPPU, S.S., PAPPU, H.R., TIGHT, D., BENSCHER, D., FUTCH, S.H., RUCKS, P., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 1996b. Molecular cloning and sequencing of coat protein genes of citrus tristeza virus isolated from Meyer lemon and homely tangor trees in Florida. In: J.V. da Graça, P. Moreno, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 13th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 47-53.
- COSTA, A. S., GRANT, T.J. 1951. Studies on transmission of the tristeza virus by the vector *A. citricidus*. *Phytopathology* 41: 105-113.
- DEL VAS, M., DISTÉFANO, A.J., VÁSQUEZ-ROVERE, C., HOPP, H.E. 2004. Parte VIII: Capítulo 4. Técnicas de ingeniería genética para conferir resistencia a virus en plantas. In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. V. Echenique, C. Rubinstein, L. Mroginski (eds.). INTA, Buenos Aires, Argentina. 293-302.
- DICKSON, R.C., FLOCK, R.A., JOHNSON, M.McD. 1951. Insect transmission of Citrus quick decline. *Journal of Economic Entomology* 44: 172-176.
- DICKSON, R.C., JOHNSON, M.M., FLOCK, R.A., LAIRD Jr., E.F. 1956. Flying aphid populations in southern California citrus groves and their relation to the transmission of the tristeza virus. *Phytopathology* 46: 204-10.
- DODDS, J.A., BAR-JOSEPH, M. 1983. Double-stranded RNA from plants infected with Closterovirus. *Phytopathology* 73: 419-423.
- DODDS, J.A., JARUPAT, T., LEE, J.G., ROISTACHER, C.N. 1987a. Effects of strain, host, time of harvest, and virus concentration on double-stranded RNA analysis of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 77: 442-447.
- DODDS, J.A., JARUPAT, T., ROISTACHER, C.N., LEE, R. 1987b. Detection of strain specific double-stranded RNAs in citrus species infected with citrus tristeza virus: A Review. *Phytophylactica* 19: 131-137.

- DOMÍNGUEZ, A., GUERRI, J., CAMBRA, M., NAVARRO, L., MORENO, P., PEÑA, L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 19: 427-433.
- DOMÍNGUEZ, A., HERMOSO DE MENDOZA, A., GUERRI, J., CAMBRA, M., NAVARRO, L., MORENO, P., PEÑA, L. 2002. Pathogen-derived resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) in transgenic Mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.) Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 10: 1-10.
- DRAKE, R.J., WALLACE, J.M. 1951. Evidence of the virus nature of quick decline. *California Citrograph* 32: 88-89.
- D'URSO, F., AYLLÓN, M.A., 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 expresion 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.
- FAGOAGA, C., LÓPEZ, C., HERMOSO DE MENDOZA, A., MORENO, P., NAVARRO, L., FLORES, R., PEÑA, L. 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of *Citrus tristeza virus* confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biology* 60: 153-165.
- FAWCETT, H.S., WALLACE, J.M. 1946. Evidence of virus nature of citrus quick decline. *California Citrograph* 32:88-89.
- FEBRES, V.J., ASHOULIN, L., MAWASSI, M., FRANK, A., BAR-JOSEPH, M., MANJUNATH, K.L., LEE, R., NIBLETT, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.
- FEBRES, V.J., NIBLETT, C.L., LEE, R.F., MOORE, G.A. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with citrus tristeza closterovirus genes. *Plant Cell Reports* 21:421-428.
- FORNER, V.J., ALCAIDE, A. 1993. La mejora genética de patrones tolerantes a tristeza en España: 20 años de historia (I). *Levante Agrícola* 325: 261-267.
- FORNER, V.J., ALCAIDE, A. 1994. La mejora genética de patrones tolerantes a tristeza en España: 20 años de historia (II). *Levante Agrícola* 329: 273-279.
- FORNER, V.J., FORNER, M.A. 2003. El programa de mejora genética de patrones de agrios en España. *Citrus* 23: 13-21.
- FRASER, L. 1952. Seedling yellows an unreported virus disease of citrus. *The Agricultural Gazete New South Wales* 63: 125-131.
- GAGO-ZACHERT, S.P., COSTA, N.B., SEMORILE, L., GRAU, O. 1999. Sequence variability in p27 gene of citrus tristeza virus (CTV) revealed by SSCP analysis. *Electronic Journal of Biotechnology* 2: 3-4.

- GARNSEY, S.M., MÜLLER, G.W. 1986. Efficiency of mechanical transmission of citrus tristeza virus (CTV). In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 46-54.
- GARNSEY, S. M., LEE, R.F. 1988. Tristeza. 48-50. In: Compendium of citrus diseases. J.O. Whiteside, S.M. Garnsey, L.W. Timmer (Eds.). The American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul Minnesota, USA. 80 p.
- GARNSEY, S.M., CAMBRA, M. 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for citrus pathogens. 193-216. In: Graft-Transmissible Diseases of Citrus. Handbook for Detection and Diagnosis. C.N. Roistacher (ed.). FAO, Rome. 286 p.
- GARNSEY, S.M., GONSALVEZ, D., PURCIFULL, D.E. 1977. Mechanical transmission of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 67: 965-968.
- GARNSEY, S.M., GONSALVES, D., PURCIFULL, D.E. 1979. Rapid diagnosis of citrus tristeza virus infection by SDS immuno-diffusion procedures. *Phytopathology* 69: 88-95.
- GARNSEY, S.M., CHRISTIE, R.G., DERRICK, K.S., BAR-JOSEPH, M. 1980. Detection of citrus tristeza virus. II Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. In: E.C. Calavan, S.M. Garnsey, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 8th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Mildura. 9-17.
- GARNSEY, S.M., BARRET, H.C., HUTCHKINSON, D.J. 1987a. Identification of Citrus tristeza virus resistance in citrus relatives and its potential applications. *Phytophylactica* 19: 187-191.
- GARNSEY, S.M., GUMPF, D.J., ROISTACHER, C.N., CIVEROLO, E.L., LEE, R.F., YOKOMI, R.K. and BAR-JOSEPH, M. 1987b. Toward standardized evaluation of the biological properties of citrus tristeza virus. *Phytophylactica* 19:151-157.
- GARNSEY, S.M., KANO, T., PERMAR, T.A., CAMBRA, M., KOIZUMI, M., VELA, C. 1989. Epitope diversity among citrus tristeza virus isolates. *Phytopathology* 79: 1174 (Abstr.).
- GARNSEY, S.M., CIVEROLO, E., GUMPF, D. YOKOMI, R., LEE, R. 1991. Development of a worldwide collection of citrus tristeza virus isolates. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 113-120.
- GARNSEY, S.M., PERMAR, T.A., CAMBRA, M., HENDERSON, C.T. 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of citrus tristeza virus (CTV). In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 39-50.
- GARNSEY, S.M., CIVEROLO, E.L., GUMPF, D.J., PAUL, C., HILF, M-E-, LEE, R.F., BRLANSKY, R.H., YOKOMI, R.K. HARTUNG, J.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.
- GHORBEL, R., NAVARRO, L., DURAN-VILA, N. 1998. Biological characterization of citrus tristeza virus isolates by *in vitro* tissues cultures. *Plant Pathology* 47: 333-340.

- GHORBEL, R., DOMÍNGUEZ, A., NAVARRO, L., PEÑA, L. 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic tree containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiology* 20: 1183-1189.
- GIACOMETTI, D.C., COSTA, A.S. 1958. Nursery behavior of infected West Indian lime scions on tristeza tolerant rootstocks. *Plant Dis. Repr.* 42: 928-31.
- GONSALES, D. 1995. Tomato Ring Spot Virus. 70-71. In: Compendium of stone fruit diseases. J.M. Ogawa; E.I. Zehr; G.W. Bird; D.F. Ritchie; K. Uriu; J.K. Uyemoto (eds.). American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 98 p.
- GONSALVES, D., GARNSEY, S.M., PURCIFULL, D.E. 1977. Research on citrus tristeza virus generates some rapid identification procedures. *Proceedings of the Florida State Horticulture Society* 90:75-79.
- GONSALVES, D., PURCIFULL, D.E., GARNSEY, S.M. 1978. Purification and serology of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 68: 553-559.
- GOTTWALD, T.R., CAMBRA, M., MORENO, P. 1993. The use of serological assays to monitor spatial and temporal spread of citrus tristeza virus in symptomless trees in Eastern Spain. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). *Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 51-61.
- GOTTWALD, T.R., CAMBRA, M., MORENO, P., CAMARASA, E., PIQUER, J. 1996a. Spatial and temporal analyses of citrus tristeza virus in Eastern Spain. *Phytopathology* 86: 45-55.
- GOTTWALD, T.R., GARNSEY, S.M., CAMBRA, M., MORENO, P., IREY, M., BORBÓN, J. 1996b. Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza. In: J.V. da Graça, P. Moreno, R.K. Yokomi (eds.). *Proceedings of the 13th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 120-129.
- GOTTWALD, T.R., GARNSEY, S.M., BORBÓN, J. 1998. Increase and patterns of spread of citrus tristeza virus infections in Costa Rica and the Dominican Republic in the presence of the brown citrus aphid, *Toxoptera citricida*. *Phytopathology* 89: 621-635.
- GOTTWALD, T.R., GIBSON, G.J., GARNSEY, S.M., IREY, M. 1999. Examination of the effect of aphid vector population composition on the spatial dynamics of citrus tristeza virus spread by Stochastic Modeling. *Phytopathology* 89: 603-606.
- GOTTWALD, T.R., POLEK, M., RILEY, K.M. 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central valley. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). *Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 83-94.
- GOWDA, S., SATYANARAYANA, T., DAVIS, C.L., NAVAS-CASTILLO, J., ALBIATH-MARTÍ, M.R., MAWASSI, M., KALKOV, N., BAR-JOSEPH, M., MORENO, P., DAWSON, W.O. 2000. The p20 gene product of citrus tristeza virus accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274: 246-254.

- GRANT, T.J., HIGGINS, R.P. 1957. Occurrence of mixtures of tristeza virus strains. *Phytopathology* 47: 305-317.
- GUMPF, D.J., ZHENG, C-Y., MORENO, P., DIAZ, J.M. 1987. Production and evaluation of specific monoclonal antibodies to citrus tristeza virus strains. *Phytophylactica* 19: 159-161.
- GUTIERREZ, E., LUTH, M.A., MOORE, G.A. 1997. Factors affecting the *Agrobacterium*-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of Citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16: 745-753.
- HALBERT, S.E., BROWN, L.G. 1998. *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), Brown citrus aphid- Identification, biology, and management strategies. Florida Department of Agriculture and Consumer Services, Division of Plant Industry, Gainesville, Florida. Entomology Circular N° 374. 6p.
- HALBERT, S.E., GENC, H., CEVIK, B., BROWN, L.G., ROSALES, I.M., MANJUNATH, K.L., POMERINKE, M., DAVIDSON, D.A., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 2004. Distribution and characterization of *Citrus tristeza virus* in south Florida following establishment of *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 88: 935-941.
- HALL, R.D. 1994. Treating tristeza in the San Joaquin Valley. Is the cure worse than the disease? *California Grower*: 30-32.
- HERRERA, G., MADARIAGA, M., SANTELICES, M. 1995. Detección del virus de la tristeza (CTV), en la zona central de Chile. *Agricultura Técnica* 55: 167-169.
- HERMOSO DE MENDOZA, A., BALLESTER-OLMOS, J.F., PINA J.A. 1984. Transmission of citrus tristeza virus by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: S.M. Garnsey, L.W. Timmer, J.A. Dodds (eds.). Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 23-27.
- HERMOSO DE MENDOZA, A., BALLESTER-OLMOS, J.F., PINA, J.A. 1988a. Comparative aphid transmission of a common citrus tristeza isolates and a seedling yellows isolate recently introduced in to Spain. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 68-70.
- HERMOSO DE MENDOZA, A., BALLESTER-OLMOS, J.F., PINA, J.A., SERRA, J., FUERTES, C. 1988b. Differences in transmission efficiency of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* using sweet orange, mandarin or lemon trees as donor or receptor hosts plants. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 62-64.
- HILF, M.E., KARASEV, A.V., ALBIATH-MARTÍ, M.R., DAWSON, W.O., GARNSEY, S.M. 1999. Two paths of sequence divergence in the citrus tristeza virus complex. *Phytopathology* 89: 336-342.
- HILF, M.E., GARNSEY, S.M. 2000. Characterization and classification of citrus tristeza virus isolates by amplification of multiple molecular markers. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 18-27.

- HILF, M.E., GARNSEY, S.M. 2002. Citrus tristeza virus in Florida: A synthesis of histological and contemporary biological, serological and genetic data. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 13-20.
- HILF, M.E., MAVRODIEVA, A., GARNSEY, S. 2005. Genetic marker analysis of a global collection of isolates of *Citrus tristeza virus*: Characterization and distribution of CTV genotypes and association with symptoms. *Phytopathology* 95: 909-917.
- HUGHES, W.A., LISTER, C.A. 1949. Lime dieback in the Gold Coast, a virus disease of the lime, *Citrus aurantifolia* (Christmann) Swingle. *Journal of Horticultural Science* 28: 131-140.
- IICA. 1996. En Chile erradican la mosca del Mediterráneo. Perú amplía control biológico. http://www.iica.int/comuniica/n_1/espanol/exp_erradic.htm
- IREY, M., PERMAR, T.A., GARNSEY, S. M. 1988. Identification of severe isolates of citrus tristeza virus in young field plantings by enzyme-linked immunosorbent assay. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 101: 73-76.
- KANO, T., GARNSEY, S.M., KOIZUMI, M., PERMAR, T.A. 1991. Serological diversity of field sources of citrus tristeza virus (CTV) in Japan. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 51-55.
- 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., GARNSEY, S.M., LEWANDOWSKY, D.J., DAWSON, W.O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208: 511-520.
- KARASEV, A.V. 2000. Genetic diversity and evolution of Closterovirus. *Annual Review of Phytopathology* 38: 293-324.
- KITAJIMA, E.W., SILVA, D.M., OLIVEIRA, A.R., MÜLLER, G.M., COSTA, S.A. 1964. Thread-like particles associated with tristeza disease of citrus. *Nature*: 201: 1011-12.
- KITAJIMA, E.W. 1965. Electron microscopical investigations on tristeza. In: W.C. Price (ed.). Proceedings of the 3d. Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 1-9.
- LEE, R.F., BRLANSKY, R.H., GARNSEY, S.M., YOKOMI, R.K. 1987. Traits of citrus tristeza virus important for mild strain cross protection of citrus: the Florida approach. *Phytophyllactica* 19: 215-218.
- LIN, Y., RUNDELL, P.A., POWELL, C.A. 2002. In situ immunoassay (ISIA) of field grapefruit trees inoculated with mild isolates of citrus tristeza virus indicates mixed infections with severe isolates. *Plant Disease* 86: 458-461.
- LÓPEZ, C., AYLLÓN, M.A., NAVAS-CASTILLO, J., GUERRI, J., MORENO, P., FLORES, R. 1998. Molecular variability of the 5'- and 3'-terminal regions of citrus tristeza virus RNA. *Phytopathology* 88: 685-691.

- LÓPEZ, C., NAVAS-CASTILLO, J., GOWDA, S., MORENO, P., FLORES, R. 2000. The 23-kDA protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* 269: 462-470.
- LU, R., FOLIMONOV, A., SHINTAKU, M., LI, W.-X., FALK, B.W., DAWSON, W.O., DING, S.W. 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 15742-15747.
- MANJUNATH, K.L., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 2000. Recent advances in the molecular biology of citrus tristeza closterovirus. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). *Proceedings of the 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 1-11.
- MARROQUÍN, C., OLMOS, A., GORRIS, M.T., BERTOLINI, E., MARTÍNEZ, M.C., CARBONELL, E.A., HERMOSO de MENDOZA, A., CAMBRA, M. 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research* 100: 101-108.
- MAWASSI, M., KARASEV, A., MIETKIEWSKA, E., GAFNY, R., LEE, R., DAWSON, W., BAR-JOSEPH, M. 1995. Defective RNA molecules associated with citrus tristeza virus. *Virology* 208 (1): 383-387.
- MAWASSI, M., MIETKIEWSKA, E., GOFMAN, R., YANG, G., BAR-JOSEPH, M. 1996. Unusual sequence relationship between two isolates of citrus tristeza virus. *Journal of General Virology* 77: 2359-2364.
- MENEZHINI, M. 1946. Sobre a natureza e transmissibilidade do doencia "tristeza" dos citrus. *O. Biologico* 12: 285-287.
- MESTRE, P.F., ASSINS, M.J., CARBONELL, E.A., NAVARRO, L. 1997. New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to citrus tristeza virus. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 691-695.
- MIRCETICH, S.M., SANBORN, S.A., RAMOS, D.E. 1980. Natural spread, graft transmission and possible ethiology of walnut blackline disease. *Phytopathology* 70: 962-968.
- MIYAKAWA, T. 1987. Strains of citrus tristeza virus in Japan. *Phytophyllactica* 19: 139-144.
- MORENO, P., PIQUER, J., PINA, J.A., JUAREZ, J., CAMBRA, M. 1986. Spread of citrus tristeza virus in a heavily infested citrus area in Spain. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). *Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 71-76.
- MORENO, P., GUERRI, J., MUÑOZ, N. 1990. Identification of Spanish strains of citrus Tristeza virus by analisis of double-stranded RNA. *Phytopathology* 80: 477-482.
- MORENO, P., GUERRI, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., FUERTES-POLO, C., ALBIACH, R., MARINEZ, M. 1993. Variations in the pathogenicity and double-stranded RNA (dsRNA) patterns of citrus tristeza virus isolates induced by host passage. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). *Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.* 8-15.
- MORENO, P., GUERRI, J., RUBIO, L., VIVES, C., SAMBADE, A., MARTÍN, S., MOYA, P., AMBRÓS, S. 2007. Variabilidad del agente casual de la tristeza de los cítricos: avances y

perspectivas. Fitopatología Brasileira. Brazilian Phytopathology. Revista Oficial da Sociedade Brasileira de Fitopatología. Vol 88 Suplemento Agosto de 2007. 104-106.

MOREIRA, S. 1942. Observações sôbre a "tristeza" dos citrus ou "podridão das radículas". *O. Biológico* 8: 269-72.

MÜLLER, G.W., COSTA, A.S. 1968. Further evidence on protective interference in citrus tristeza. In: J.V. da Graça, R.F. Lee, R.K. Yokomi (eds.). Proceedings of the 4th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Gainesville. 71-83.

MÜLLER, G. W., COSTA, A.S., KITAJIMA, E.W., CAMARGO, J.B. 1974. Additional evidence that tristeza virus multiplies in *Passiflora* spp. In: Weathers, Cohen (eds.). Proceedings of the 6th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 75-78.

NARVÁEZ, G., BEN SLIMANE, S., AYLLÓN, M.A, RUBIO, L., GUERRI, J., MORENO, P. 2000. A new procedure to differentiate citrus tristeza isolates by hybridization with digoxigenin-labeled cDNA probes. *Journal of Virological Methods* 85: 83-92.

NAVARRO, L. 1993. Status reports-budwood-registration-program. Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 28-32.

NAVARRO, L. 2000. Saneamiento, cuarentena y certificación de cítricos. Pags. 117-123. In: Enfermedades de los cítricos. P. Moreno, N. Durán-Vila (eds.). Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología. Nº2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa. 165 pp.

NAVARRO, L., JUÁREZ. J. 1977. Tissue culture techniques used in Spain to recover virus-free citrus plants. *Acta Horticulturae* 78: 425-435.

NAVARRO, L., ROISTACHER, C.N., MURASHIGE, T. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free *Citrus*. *Journal American Society Horticultural Sciences* 100: 471-479.

NAVARRO, L., JUÁREZ. J., BALLESTER, K., PINA, J.A., ORTEGA, C. 1979. Obtención de plantas nucleares libres de virus de diversas variedades de agrios del grupo navel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) por cultivo de óvulos *in vitro*. Anales del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA). Ministerio de Agricultura. Serie: Protección Vegetal 12: 95-113.

NAVARRO, L., JUÁREZ. J., PINA, J.A., BALLESTER, K., ORTEGA, C. 1984. The Citrus Quarantine Station in Spain. In: S.M. Garnsey, L.W. Timmer, J.A. Dodds (eds.). Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 365-370.

NAVARRO, L., PINA, J.A., JUÁREZ, J., BALLESTER-OLMOS, J.F., ARREGUI, J.M., ORTEGA, C., NAVARRO, A., DURAN-VILA, N., GUERRI, J., MORENO, P., CAMBRA, M., ZARAGOZA, S. 2003. Situación actual de los programas de saneamiento, cuarentena y certificación de cítricos en España. *Phytoma España*: 68-73.

- NIKOLAEVA, O.V., KARASEV, A.V., GARNSEY, S.M., LEE, R.F. 1998. Serological differentiation of the citrus tristeza virus isolates causing stem pitting in sweet orange. *Plant Disease* 82: 1276-1280.
- NOLASCO, G.C., DE BLAS, C., TORRES, V., PONZ, F. 1993. A method combining immunocapture and PCR amplification in a microtiter plate for the routine diagnosis of plant viruses and subviral pathogens. *Journal of Virological Methods* 45: 201-218.
- NORMAN, P.A., GRANT, T.J. 1953. Preliminary studies of aphid transmission of tristeza virus by aphids in Florida. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 66: 89-92.
- NORMAN, P.A., GRANT, T.J. 1956. Transmission of citrus tristeza virus by aphids in Florida. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 69: 38-42.
- NORMAN, P.A., GRANT, T.J. 1959. Transmission of T3 severe strain of tristeza virus by the citrus melon aphid. *Journal of Economic Entomology* 52: 632-634.
- OEPP/EPPO. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests. Citrus tristeza closterovirus. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 34: 239-246.
- OLMOS, A., DASÍ, M.A., CANDRESSE, T., CAMBRA, M. 1996. Print-capture PCR: a simple and highly sensitive method for the detection of plum pox virus (PPV) in plant tissues. *Nucleic Acids Research* 24: 2192-2193.
- OLMOS, A., CAMBRA, M., ESTEBAN, O., GORRIS, M.T., TERRADA, E. 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed-tube. *Nucleic Acids Research* 27: 1564-1565.
- OLMOS, A., BERTOLINI, E., CAMBRA, M. 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): a new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods* 106: 51-59.
- OLMOS, A., BERTOLINI, E., GIL, M., CAMBRA, M. 2005. Real-time for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods* 128: 151-155.
- PAPPU, H.R., PAPPU, S.S., MANJUNATH, K.L., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 3641-3644.
- PAPPU, H.R., KARASEV, A.V., ANDERSON, E.J., PAPPU, S.S., HILF, M.E., FEBRES, V.J., ECKLOFF, R.M.G., McCAFFERY, M., BOYKO, V., GOWDA, S., DOLIA, V.V., KOONIN, E.V., GUMPF, D.J., CLINE, K.C., GARNSEY, S.M., DAWSON, W.O., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199: 35-46.
- PEÑA, I., BATISTA, L., ACUÑA, M., CASIN, J.C., LLAUGER, R., PÉREZ, M.C., OTERO, M. 2002. Citrus tristeza virus epidemiological surveillance and eradication program in Cuba: Recent results. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). *Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside*. 335-336.

- PERMAR, T. A., GARNSEY, S.M.; GUMPF, D.J., LEE, R.F. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80: 224-228.
- PERMAR, T. A., GARNSEY, S.M. 1991. Comparison of biological indexing and immunological assays for identifying severe Florida isolates of citrus tristeza virus. In: R.H. Bransky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 56-59.
- PINA, J.A., MORENO, P., JUÁREZ, J. GUERRI, J., CAMBRA, M., GORRIS, M.T., NAVARRO, L. 2004. A new procedure to index for *Citrus tristeza virus* induced decline on sour orange rootstock. Abstract of the XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists, IOCV. Monterrey, México. 47.
- POWELL-ABEL, P.A., NELSON, R.S., DE, B., HOFFMAN, N., ROGERS, S.G. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- POWELL, C.A., PELOSI, R.R., RUNDELL, P.A., STOVER, E., COHEN, M. 1999. Cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of citrus tristeza virus. *Plant Disease* 83: 989-991.
- POWELL, C.A., RUNDELL, P.A., PELOSI, R.R. 2003a. Suppression of decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus* by nondecline-inducing isolates. *HortScience* 38: 62-64.
- POWELL, C.A., PELOSI, R.R., RUNDELL, P.A., COHEN, M. 2003b. Breakdown of cross-protection of grapefruit from decline-inducing isolates of *Citrus tristeza virus* following introduction of the brown citrus aphid. *Plant Disease* 87: 1116-1118.
- PRADO, E. 1991. Artrópodos y sus enemigos naturales asociados a plantas cultivadas en Chile. Boletín Técnico N°169. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA, Chile. 207 p.
- PRICE, W.C. 1966. Flexous rods in phloem cells of lime plants infected with citrus tristeza virus. *Virology* 29: 285-294.
- PRIMO, E., HERNÁNDEZ, E., HERNÁNDEZ, J., MARTÍNEZ, M., CUÑAT, T., VILLA, R. 1971. Diagnóstico precoz de la tristeza del naranjo. I. Separación y reacciones serológicas de partículas nucleoproteicas. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 11: 229-235.
- RACCAH, B., LOEBENSTEIN, G., BAR-JOSEPH, M. 1976. Transmission of citrus tristeza virus by the melon aphid. *Phytopathology* 66: 1102-1104.
- ROBERTS, P.D., McGOVERN, R.J., LEE, R.F., NIBLETT, C.L. 2001. Tristeza. Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Science, University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu/CH089>
- ROCHA-PEÑA, M.A., LEE, R.F., LASTRA, R., NIBLETT, C.L., OCHOA-CORONA, F.M., GARNSEY, S.M., YOKOMY, R.K. 1995. *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats of citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79:437-445.
- ROISTACHER, C.N. 1981. A blueprint for disaster. Part 2: Changes in transmissibility of seedling yellows. *California Citrograph* 67: 28-32.

- ROISTACHER, C.N. 1988. Observations on the decline of sweet oranges trees in coastal Perú caused by stem-pitting tristeza. FAO. Plant Protection Bulletin 36: 19-26.
- ROISTACHER, C.N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. F.A.O., Rome. 286 pp.
- ROISTACHER, C.N. 1993. Arguments for establishing a mandatory certification program for citrus. *Citrus Industry* 74 (October).
- ROISTACHER, C.N. 1995. An historical review of the major graft-transmissible diseases of citrus. FAO, Regional Office for the Near East, Cairo, Egypt. 89pp.
- ROISTACHER, C.N., BAR-JOSEPH, M. 1984. Transmission of tristeza and seedlings yellows tristeza virus by *Aphis gossypii* from sweet orange, grapefruit and lemon to Mexican lime, grapefruit and lemon. In: S.M. Garnsey, L.W. Timmer, J.A. Dodds (eds.). Proceedings of the 9th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 9-18.
- ROISTACHER, C.N., GUMPF, D.J. 1986. An historical perspective on seedlings yellows virus. *Citrograph*: 189-192.
- ROISTACHER, C.N., BAR-JOSEPH, M. 1987a. Aphid transmission of citrus tristeza virus: A review. *Phytophylactica* 19: 163-167.
- ROISTACHER, C.N., BAR-JOSEPH, M. 1987b. Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* and by graft inoculation and from *Passiflora* spp. *Phytophylactica* 19: 179-182.
- ROISTACHER, C.N., MORENO, P. 1991. Tristeza. The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus. A review. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 7-19.
- ROMÁN, M.P., CAMBRA, M., JUÁREZ, P., MORENO, P., DURAN VILA, N., TANAKA, E., KITAJAMA, E.W., YAMAMOTO, P.T., BASSANEZI, R.B., TEIXEIRA, D.C., JESÚS JUNIOR, W.C., AYRES, A.J., GIMENEZ-FERNANDEZ, N., RABENSTEIN, F., GIROTTO, L.F., BOVÉ, J.M. 2004. Sudden death of citrus in Brazil: a graft transmissible bud union disease. *Plant Disease* 88: 453-467.
- ROSNER, A., LEE, R.F., BAR-JOSEPH, M. 1986. Differential hybridization with cloned cDNA sequences for detecting a specific isolate of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 76: 820-824.
- RUBIO, L., AYLLÓN, M.A., GUERRI, J., PAPPU, H., NIBLETT, C., MORENO, M. 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single strand conformation of polymorphism analysis of the coat protein gene. *Annals of Applied Biology* 129: 479-489.
- RUBIO, L., AYLLÓN, M.A., KONG, P., FERNÁNDEZ, A., POLEK, M., GUERRI, J., MORENO, P., FALK, B.W. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: Evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology* 75: 8054-8062.

- RUIZ-RUIZ, S., MORENO, P., GUERRI, J., AMBRÓS, S. 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Archives of Virology* 151: 387-398.
- SANCHEZ, L. 1996. La tristeza de los cítricos en Chile. 155-159. In: Avances en sanidad vegetal de frutales y vides. Santiago. Universidad de Chile.
- SANCHEZ, L., WEATHERS, L. 1970. La amenaza de la tristeza de los cítricos en Chile. *Agricultura Técnica* 30: 166-170.
- SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., AYLLÓN, M.A., ALBIACH-MARTÍ, M.R., RABINDRAN, S., DAWSON, W.O. 2002. The p23 protein of *Citrus tristeza virus* controls asymmetrical RNA accumulation. *Journal of Virology* 76: 473-483.
- SATYANARAYANA, T., GOWDA, S., AYLLÓN, M.A., DAWSON, W.O. 2004. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Sci. Acad. U.S.A.* 101: 799-804.
- SATYANARAYANA, T., ROBERTSON, C.J., GARNSEY, S.M., DAWSON, W.O. 2005. Generation of a genetically engineered MCA13 non reactive variante of the T36 decline isolate of *Citrus tristeza virus*. 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. 34-43.
- SCHNEIDER, H. 1954. Anatomy of bark of bud union, trunk and roots of quick decline affected sweet orange trees on sour orange rootstocks. *Hilgardia* 22: 567-581.
- SHALITIN, D., MAWASSI, M., GAFNY, R., OLEITNER, O., CABILLY, S., ESHHAR, Z., BAR-JOSEPH, M. 1994. Serological characterization of citrus tristeza virus isolates from Israel. *Annual Applied Biology* 125: 105-113.
- SILVA-VARA, S., PEÑA DEL RÍO, M.A., PEÑA-MARTINEZ, R., VILLEGAS-JIMENEZ, N., BYERLY-MURPHY, K.F., ROCHA-PEÑA, M.A. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35: 441-450.
- SUASTIKA, C., NATSUAKI, T., HIROTSUGU, T., KANO, T., IEKI, H., OKUDA, S. 2004. Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus*. *Journal of General Plant Pathology*: 67:73-77.
- TERRADA, E., KERSCHBAUMER, R.J., GIUNTA, G., GALEFFI, P., HIMMLER, G., CAMBRA, M. 2000. Fully "recombinant enzyme-linked immunosorbent assays" using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology* 90:1337-1344.
- TSAI, M.C., SU, H.J. 1989. Development and characterization of monoclonal antibodies to *Citrus tristeza virus* (CTV) strains in Taiwan. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 46-50.
- TSAI, M.C., SU, H.J., 1991. Development and characterization of monoclonal antibodies to citrus tristeza virus (CTV) strains in Taiwan. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 46-50.

- TSAI, M.C., SU, H.J., GARNSEY, S. 1993. Comparative studies on stem-pitting strains of CTV in the Asian countries. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.), Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 16-19.
- VARMA, P.M., RAO, D.G, CAPOOR, S.P. 1965. Transmission of tristeza virus by *Aphis craccivora* (Koch) and *Dactynotus jaceae* L. *Indian Journal of Entomology* 27: 67-71.
- VAN VUUREN, P., COLLINS, R.P., DA GRAÇA, J.V. 1993. Evaluation of citrus tristeza isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77: 24-28.
- VAN VUUREN, P., DA GRACA. 2000. Reductions in "Marsh" grapefruit tree size infected with citrus tristeza virus populations. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 75: 542-545.
- VELA, C., CAMBRA, M., CORTÉS, E., MORENO, P., MIGUET, J., PÉREZ DE ROMÁN, C., SANZ, A. 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the tristeza virus and their use for diagnosis. *Journal General Virology* 67: 91-96.
- VELA, C., CAMBRA, M., SANZ, A., MORENO, P. 1988. Use of specific monoclonal antibodies for diagnosis of citrus tristeza virus. In: L.W. Timmer, S.M. Garnsey, L. Navarro (eds.). Proceedings of the 10th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 55-61.
- VIVES, M.C., RUBIO, L., LÓPEZ, C., NAVAS-CASTILLO, J., ALBIACH.MARTÍ, M.R, DAWSON, W.O., GUERRI, J., FLORES, R., MORENO, P. 1999. The complete genome of the mayor component of mild *Citrus tristeza virus* isolate. *Journal of General Virology* 80: 811-816.
- WALLACE, J.M. 1978. Virus and viruslike diseases. In: The Citrus Industry, Volume IV. Pp: 67-184. W. Reuther, E.C. Calavan and G.E. Carman (eds.). University of California, Division of Agriculture Sciences, California, USA. 362 p.
- WALLACE, J.M.; DRAKE, R.J. 1951. Newly discovered symptoms of quick decline and related diseases. *Citrus leaves* 31: 8-9, 30.
- WALLACE, J.M., OBERHOLZER, P.C.J., HOFMEYER, J.D.J. 1956. Distribution of viruses of tristeza and other diseases of citrus in propagative material. *Plant Disease Reporter* 40: 3-9.
- WEATHERS, L.G., SÁNCHEZ, L. 1970. Tristeza disease of citrus in Chile. *Plant Disease Reporter*. 54: 542-44.
- WEATHERS, L.G., SÁNCHEZ, L., PLATT, R.C. 1969. Naturaleza y distribución de las enfermedades virosas de cítricos en Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 29: 166-170.
- YANG, Z.N., MATHEWS, D.M., DODDS, J.A., MIRKOV, T.E. 1999. Molecular characterization of an isolate of *Citrus tristeza virus* that causes severe symptoms in sweet orange. *Virus Genes* 19: 131-142.
- YOKOMI, R.K., GARNSEY, S.M. 1987. Transmission of citrus tristeza virus by *Aphis gossypii* and *Aphis citricola* in Florida. *Phytophyllactica* 19: 169-172.

- YOKOMI, R.K., OLDFIELD, G. N. 1991. Seasonal fluctuations of alate aphid activity in California citrus groves. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 71-76.
- YOKOMI, R.K., LASTRA, R., STOETZEL, M.B., DAMSTEEGT, V.D., LEE, R.F, GARNSEY, S.M., GOTTWALD, T.R., ROCHA-PEÑA, M.A., y NIBLETT, C.L. 1994. Establishment of the brown aphid (Homoptera: Aphididae) in Central and the Caribbean basin and transmission of citrus tristeza virus. *J. Econ. Entomol.* 87: 1078-1085.
- YOSHIDA, T. 1996. Graft compatibility of *Citrus* with plants in the *Aurantioideae* and their susceptibility to citrus tristeza virus. *Plant Dis.* 80: 414-417.
- ZEBZAMI, M., HILL, J.H., VAN DEUSEN, R.A., NADORI, E.B. 1993. Characterization of monoclonal antibodies raised against citrus tristeza virus in Morocco. In: P. Moreno, J.V. da Graça, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 12th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 93-99.
- ZEBZAMI, M., SOARES, C.M., BAILEY, A.M., NIBLETT, C.L., NOLASCO, G. 2002. Comparison of molecular and biological characteristics of fourteen Moroccan isolates of *Citrus tristeza virus*. In: N. Duran-Vila, R.G. Milne, J.V. da Graça (eds.). Proceedings of the 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside. 8-12.