



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Evaluación de patrones para lima tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) frente a *Citrus tristeza virus* (CTV)

Johnny Camilo Beltrán Montoya

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Agronomía (Escuela de posgrados)
Bogotá, Colombia

2012

Evaluación de patrones para lima tahití (*Citrus latifolia* Tanaka) frente a *Citrus tristeza virus* (CTV)

Johnny Camilo Beltrán Montoya

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias agrarias con énfasis en fitoprotección integrada

Director:

Ph.D., Oscar Arturo Oliveros Garay

Línea de Investigación:

Virus de plantas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad, Agronomía (Escuela de posgrados)
Bogotá, Colombia

2012

¡Estudiemos y capitalicemos conocimiento!

Lo que aprendemos a hacer y lo que tenemos en la cabeza es lo único que nos queda hasta el día de nuestra muerte. Las cosas materiales son polvo que arrastra el viento.

A mi mamá, esposa e hijo.

Agradezco el apoyo y tiempo para llevar a cabo mis estudios.

¡La felicidad es tan tangible que podemos ser felices cuando queramos y nos decidamos a serlo!

Agradecimientos

Al grupo del laboratorio de biotecnología vegetal de la facultad de agronomía de la Universidad Nacional de Colombia.

Al profesor Oscar Oliveros agradezco brindarme la posibilidad de trabajar en este proyecto y por su aporte intelectual.

Al doctor Javier Orduz y su grupo de trabajo por el apoyo y oportuna colaboración

A Walter Turizo por su oportuna colaboración y la amistad gestada en el transcurso de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio por hacer un sano equipo de trabajo.

A Corpoica por poner a disposición sus instalaciones, enfocadas en la investigación especializada de cítricos y por la colaboración de las personas que hicieron posible este trabajo.

Resumen

En el presente trabajo se evaluó la respuesta de patrones para lima Tahití frente a infecciones de *Citrus tristeza virus*. El documento se divide en tres capítulos. El primer capítulo es una revisión general del estado del arte de CTV, que abarca generalidades sobre sus hospederos, distribución, genoma viral, síntomas que generan las diferentes cepas y antecedentes de lima Tahití en Colombia. El segundo capítulo abarca la identificación de cepas de CTV que infectan en campo mediante el uso de primers específicos de los genes de la polimerasa y p23, y secuenciación de los productos de PCR. Los resultados muestran que las cepas de genotipos VT son las de mayor incidencia, solas o de manera mixta con cepas T30 y T36. El tercer capítulo presenta los resultados de la respuesta de expresión de “stemp pitting” de lima Tahití injertada sobre seis patrones diferentes y su relación con los genotipos de CTV que infectan en campo. La relación de dependencia entre patrones, respuesta sintomática y genotipos de CTV se realizó mediante test de independencia de chi-cuadrado. Se identificó que la respuesta de stem pitting es dependiente del patrón y de la localidad geográfica, pero independiente de la mezcla de cepas que infectaron los cítricos.

Palabras clave: Lima Tahití, CTV, PCR, patrón.

Abstract

This study evaluated the response Tahitian lime grafted in different citrus rootstocks against *Citrus Tristeza Virus* infections. The document is divided into three chapters. The first chapter is an overview of the state of the art of CTV covering their hosts, distribution, viral genome, symptoms induced by different strains and Tahitian lime characteristics. The second chapter deals with the identification of CTV isolates that infect field using PCR and specific primers for polymerase and p23 genes, and sequencing of the PCR products. Results reveal VT genotypes strains exhibited the highest incidence, alone or

mixed with strains such T30 and T36. The third chapter deals with the response of stem pitting expression in Tahitian lime grafted on six different rootstocks and their relationship with CTV genotypes found in the Colombian field. A dependency relationship between citrus patterns, symptomatic response and CTV genotypes was performed using chi-square independence. It was found dependency response between stem pitting rootstocks and geographical locality, but independency relationship of the mixture of genotypes infecting a specific citrus.

Key words: Tahitian lime, CTV, PCR, rootstock.

Contenido

Tabla de contenido

Resumen	IX
Introducción	15
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
1. Estado del arte	18
1.1 Tristeza de los cítricos.....	18
1.2 Agente causal: <i>Citrus Tristeza Virus</i>	19
1.2.1 Genoma Viral	20
1.2.2 Síntomas causados por CTV.....	22
1.2.3 Transmisión	25
1.3 Hospedero: <i>Citrus latifolia</i> Tanaka (Lima Tahití).....	25
1.4 Bibliografía	28
2. Identificación de cepas de <i>Citrus Tristeza Virus</i> mediante marcadores moleculares de genotipo específico en plantas de <i>Citrus latifolia</i> (Tanaka)	34
Resumen	34
2.1 Introducción	35
2.2 Materiales y métodos	37
2.2.1 Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	39
2.3 Resultados	41
2.4 Discusión	46
2.5 Bibliografía	47
3. Patrones para lima Tahití <i>C. latifolia</i> (Tanaka) frente a la severidad de stem pitting ocasionado por <i>Citrus Tristeza Virus</i>	51
3.1 Introducción	52
3.2 Materiales y métodos.	54
3.3 Resultados	58
3.4 Discusión	61
3.5 Bibliografía	63
Conclusiones	67

Lista de figuras

Figura 1-1: Distribución mundial del virus de la tristeza de los cítricos.....	4
Figura 1-2: Micrografía electrónica de cepas purificadas de CTV.....	6
Figura 1-3: Organización del genoma viral de CTV. Tomado de Karasev <i>et al.</i> , 1995.....	7
Figura 1-4: Clasificación de asilamientos de CTV propuesta por Hilf <i>et al.</i> , 2005.....	9
Figura 1-5: Clasificación de asilamientos de CTV propuesta por Sambade <i>et al.</i> , 2003.....	9
Figura 1-6: Síntomas causados por CTV. Tomado de Moreno <i>et al.</i> , 2008.....	11
Figura 2-1: Esquema de toma de muestras y flujo de decisión para seleccionar plantas a evaluar	22
Figura 2-2: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones de VT-POL de CTV (695 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto Corpoica La Libertad	26
Figura 2-3: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones T30 POL de CTV (696 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad.....	26
Figura 2-4: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones T36 POL de CTV (714 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad.....	27
Figura 2-5: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones del gen P23 de CTV de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad.....	28
Figura 2-6: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones de CTV (p23) de las muestras de lima tahti colectadas en el huerto ubicado en Corpoica Nataima.....	29
Figura 3-1: Patrones micro injertados con lima Tahití y establecidos en campo.....	39
Figura 3-2: Escala diagramática para la evaluar la intensidad de acanaladuras de tallo. Tomada de Meissner-Filho <i>et al.</i> (2002).....	40
Figura 3-3: Distribución de las cepas de CTV que infectaron de manera natural en campo.....	41
Figura 3-4: Severidad de stem pitting (dimensión 2) vs patrón y localidad (dimensión 1).....	44
Figura 3-5: Severidad de stem pitting vs asilamientos de CTV.....	45

Lista de tablas

Tabla 2-1: Primers utilizados para detección de CTV. Tomado de Hilf <i>et al.</i> , 2005 y Sambade <i>et al.</i> , 2003.....	25
Tabla 2-2: Resumen de identidad de las secuencias de las muestras con accesiones del GeneBank.....	29
Tabla 3-1 Tabla de frecuencia de la severidad en stem pittin en diferentes patrones y dos localidades diferentes.....	43

Abreviaturas

Abreviatura	Término
--------------------	----------------

CTV	<i>Citrus tristeza virus</i>
SP	Stem pitting
QD	Quick decline

Introducción

A nivel mundial los cítricos son cultivados en el subtropico y en el trópico, sin embargo, las principales zonas productoras del mundo se encuentran ubicadas en el subtrópico entre los 25 y 40 grados de latitud en ambos hemisferios y se denomina como el cinturón citrícola conformado por California, Florida, China, Japón, Brasil, Argentina, Australia y Suráfrica. Según la encuesta Nacional Agropecuaria de 2010, en Colombia hay plantadas 62.409 ha de cítricos, de las cuales 36.943 ha están sembradas en naranja y 25.466 ha plantadas entre mandarina, tangelo y limas ácidas. El grupo de las limas ácidas está compuesto por la lima Tahití (*Citrus latifolia*) y el limón pajarito (*Citrus aurantifolia*), estas son originarias del archipiélago malayo, no toleran bajas temperaturas y alcanzan la mejor calidad interna y coloración en las regiones tropicales cálidas (Orduz-Rodriguez, 2012). El cultivo de lima Tahití en Colombia tiene altas potencialidades en cuanto a diversificación de cultivos y exportación, el país tiene tierras aptas para el establecimiento de cultivos, la demanda interna no está satisfecha y en los momentos de desabastecimiento es necesario importar limón verdadero, sin embargo, el modelo de producción no cuenta con paquetes tecnológicos que garanticen la sanidad vegetal del y presenta diversas limitaciones fitosanitarias. En Colombia la tristeza de los cítricos tiene alto impacto sobre lima tahiti que es uno de los hospederos más susceptibles. En campo hay alta presión de áfidos vectores, las prácticas de vivero no garantizan material vegetal libre de virus o como mínimo infectado con cepas suaves y se constituyen como una fuente de diseminación regional de enfermedades. Las estrategias de manejo de tristeza son (1) material vegetal libre de virus, (2) selección de patrones para conferir tolerancia, (3) erradicación de plantas infectadas con cepas severas, (4) esquemas de protección cruzada (5) movilización de material vegetal sano, (6) regulación oficial sobre los productores de material vegetal. Mediante estudios previos del centro de investigación C.I Corpoica La libertad, se han reconocido patrones para lima tahiti con buen potencial de adaptación a condiciones agroecológicas de las zonas de producción.

Las limitaciones tecnológicas del cultivo de lima Tahití están constituidas principalmente por la falta de material de propagación con características de calidad, resistencia a enfermedades y adaptación a condiciones edafoclimáticas. El patrón volkameriana es el más usado en la citricultura colombiana, tiene ventajas debido a su precocidad, pero el color de los frutos generados es verde claro, lo que disminuye el interés en el mercado de exportación. Lima Tahití es uno de los hospedantes más sensibles al virus de la tristeza de los cítricos y esta es una de las principales limitaciones de la longevidad de los cultivos. En los llanos orientales se reporta tiempo de vida útil de los huertos llega hasta los ocho diez años máximo causa de la severidad de CTV. En este sentido, el fortalecimiento tecnológico para la producción de limas ácidas en Colombia requiere la evaluación de patrones y programas de selección de materiales promisorios de alta productividad que generen garantías para aumentar el área sembrada y la reconversión de los materiales de producción que actualmente son utilizados.

En la citricultura moderna el esquema de propagación se basa en el uso de injertos con el fin de generar precocidad en la producción, resistencia a la planta frente a enfermedades y adaptación a suelos. El injerto cítrico se compone de un patrón y una copa. El patrón confiere varias características de producción y repuesta a enfermedades sistémicas a la planta, debe presentar alta compatibilidad con la copa, buena adaptación a clima y suelos, confiere más de 20 características a la planta cítrica, entre ellas el vigor, tolerancia a factores abióticos como salinidad, acidez, resistencia o tolerancia frente a enfermedades como *Phytophthora. sp*, *Citrus Tristeza Virus*, *Citrus psorosis virus*, *Citrus exocortis viroid*, entre otros. La copa debe provenir de plantas madres sanas (libres de virus), con características de alto rendimiento y calidad de frutos. En el presente trabajo se evaluó la respuesta de patrones para copas de lima Tahití, obtenidas a partir de yemas libres de virus, respecto al carácter de conferir tolerancia frente a infección de *Citrus Tristeza Virus*. En trabajos previos realizados por el banco de germoplasma del C.I. Corpoica Palmira se obtuvieron micro-injertos de lima Tahití libres de tristeza de los cítricos con patrones promisorios en citricultura, el comportamiento de los cuales fue subsecuentemente evaluado en campo.

La principal fuente de diseminación de CTV es la movilización de material infectado de cítricos. Los viveros de propagación en Colombia no cuentan con un programa de certificación de yemas libres de virus. La falta de regulación en el transporte de cítricos puede generar un flujo de CTV a nivel regional. La diseminación local es mediada por

áfidos vectores presentes en campo como *Aphis gossipy* y *Toxoptera citricida*. Las medidas de manejo de CTV deben incluir cuarentena de algunas cepas severas, programas de certificación de yemas, el uso de patrones tolerantes y protección cruzada con cepas suaves dependiendo de la incidencia y las cepas predominantes de cada zona (Moreno *et al.*, 2009). El uso de patrones tolerantes a CTV constituye una estrategia de importancia para el manejo de la tristeza de los cítricos y la modernización de la citricultura del país. Para generar programas de protección cruzada, es necesaria la identificación de cepas suaves y la evaluación de su potencial para la protección frente a cepas severas locales.

En el marco de este trabajo se espera que el material plantado en campo se infecte con las cepas locales asociados a la región geográfica, razón por la cual la evaluación de este material se realizó a los dos años de establecido el cultivo en campo. Durante este periodo, el material en campo estaría expuesto a infecciones por las cepas locales de CTV que son inoculadas por áfidos vectores. Estos árboles probablemente expresan síntomas de tristeza asociados a la especificidad del genotipo viral, el patrón y la zona de evaluación.

El presente trabajo se compone de tres capítulos principales. El primero presenta una revisión general del estado del arte, el segundo es referente a un artículo enfocado en la identificación de cepas de CTV en campo infectando lima Tahití, el tercer capítulo es un artículo que trata de la respuesta de las plantas de lima Tahití injertadas sobre varios patrones frente a la infección de campo de cepas de CTV.

Objetivo General

Evaluar la respuesta de patrones para lima Tahití (*C. latifolia* Tanaka) frente a *Citrus Tristeza Virus* (CTV)

Objetivos Específicos

Identificar las cepas de CTV que infectan lima Tahití (*C. latifolia*) en campo mediante RT-PCR y secuenciación.

Analizar la relación entre las cepas de CTV detectadas en campo y la respuesta sintomática inducida en *C. latifolia* injertado sobre diferentes patrones.

1. Estado del arte

1.1 Tristeza de los cítricos

La tristeza de los cítricos es una enfermedad de origen viral causada por *Citrus Tristeza Virus* (CTV). Las sinonimias de esta enfermedad son Citrus quick decline virus (Fawcett & Wallace, 1946); Citrus seedling yellows virus (Fraser, 1952); Grapefruit stem pitting virus (Oberholzer *et al.*, 1949) y Lime die-back virus (Hughes & Lister, 1949). Infecta todas las especies e híbridos de cítricos, incluso hay reportes de infección en “parientes” de los cítricos, tales como *Aeglopsis*, *Afraegle*, *Fortunella* y *Pamburus*, *Poncirus*. Fuera de las Rutáceas, el único hospedero conocido de CTV, son algunas especies de *Passiflora* (Bar Joseph *et al.*, 1989)

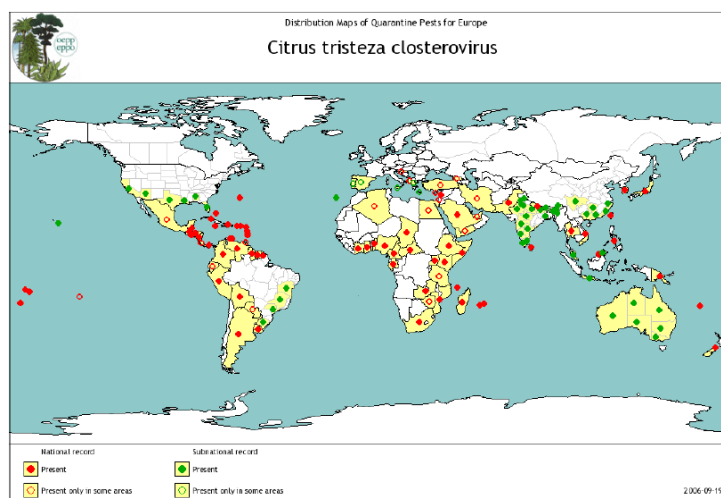


Figura 1-1: Distribución mundial del virus de la tristeza de los cítricos. CMI (1978)

El primer determinante de dispersión de la tristeza de los cítricos data del siglo XIX cuando se empezó a utilizar *Citrus auranti* (naranja agria) para conferir resistencia frente a la pudrición de raíz causada por *Phytophthora* sp. Esta experiencia ocasionó la diseminación de CTV desde zonas endémicas a zonas libres por la movilización de material infectado (Bar Joseph *et al.*, 1989). Las epidemias más importantes de tristeza se reportaron en Argentina en 1930, en Brasil en 1937, en California en 1939, en Florida en 1951, en España 1957, en Israel en 1970 y en Venezuela en 1980, (Webber, 1943; Davino *et al.*, 2003; Garnsey *et al.*, 2000). En la actualidad CTV se encuentra en la mayoría de las regiones de producción de cítricos del mundo, este virus se encuentra en países de Europa, África, Asia, Norte América, Oceanía y Sur América.

1.2 Agente causal: *Citrus Tristeza Virus*

Citrus Tristeza Virus pertenece al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*. Las partículas de este virus son descritas como filamentos flexuosos de 10 a 11 nm de diámetro y 1900 a 2000 nm de longitud. El genoma de CTV está constituido por RNA de cadena sencilla, de sentido positivo, sin cola de poli-A en el extremo 3' (Bar Joseph y Lee, 1989). Posee dos proteínas de cápside: una proteína mayor de 25 kDa que cubre el 95% de la partícula viral y una proteína menor (proteína divergente) de 27 kDa que cubre el 5% de la partícula al extremo amino terminal (Granoff & Webster, 1999)

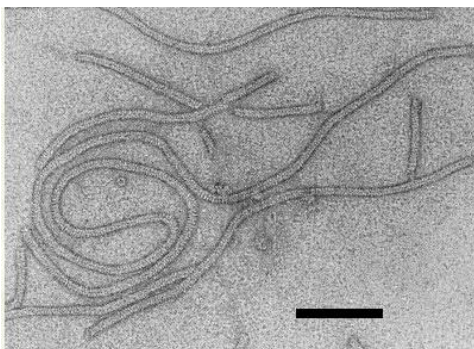


Figura 1-2: Micrografía electrónica de cepas purificadas de CTV. Tomada de: Bar Joseph y Lee, 1989AAB.

1.2.1 Genoma Viral

El RNA genómico (gRNA) de CTV se encuentra compuesto por 12 marcos de lectura abiertos (ORFs) y regiones no traducibles (UTRs) en los extremos 5' y 3'. Los ORFs 1a y 1b codifican proteínas asociadas a la replicación. El ORF 1 codifica para metiltransferasa, dos proteasas y helicasa. 1b codifica RNA polimerasa dependiente de RNA. Estas dos abarcan la mitad 5' del genoma y son traducidos directamente por el gRNA. Los 10 ORF adicionales se localizan en el extremo 3' y codifican las proteínas p33 (ORF2), p6 (ORF 3), p65 (ORF 4), p61 (ORF 5), p27 (ORF 6), p25 (ORF 7), p18 (ORF 8), p13 (ORF 9), p20 (ORF 10) y p23 (ORF 11). p65 es homóloga a proteínas de choque térmico y junto con las proteínas de la capsida p25 y p27 están involucradas con el ensamblaje del virión. p20 está asociada con la acumulación de cuerpos de inclusión en las células infectadas. La función de p33, p18 y p13 se relaciona con la capacidad de inducir infección sistémica en el rango de cítricos hospederos (Tatineni *et al.*, 2011). Los ORFs del extremo 3' de CTV se expresan a través de un set de RNAs subgenómicos 3' coterminales los cuales tienen sus versiones correspondientes de RNA negativo (Hilf *et al.*, 1995).

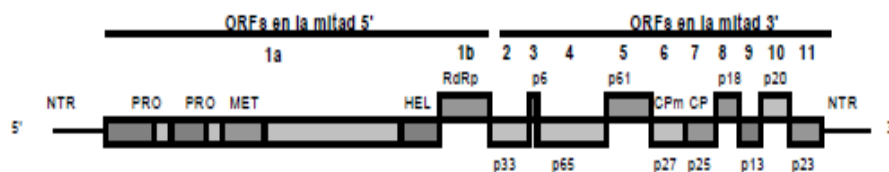


Figura 1-3: Organización del genoma viral de CTV. Tomado de Karasev *et al.*, 1995

La cubierta del virión de CTV se encuentra formada por la proteína mayor CP de 23000 Dalton y una proteína menor CPm de 21000 Dalton que se encuentran presentes en una proporción de 5 a 1 (Bar Joseph y Lee, 1989).

CTV tiene el genoma más largo entre los virus que infectan plantas, presenta variabilidad diferencial, el extremo 5' tiene mayor variabilidad que extremo 3'. Este último es relativamente conservado (aproximadamente 90% de identidad nucleotídica entre aislamientos), mientras que la identidad encontrada en el extremo 5' es menor al 70% (Hilf *et al.* 2000). Los genomas de CTV secuenciados en su totalidad son: T36 y T30 de Florida (Karasev *et al.*, 1995; Albiach-Martí *et al.*, 2000), VT de Israel (Mawassi *et al.*, 1996), T385 de España (Vives *et al.* 1999), SY568 de California (Yang *et al.* 1999),

NUagA de Japón (Suastika *et al.*, 2001), Qaha de Egipto y un aislamiento mexicano. El genoma de CTV como mínimo tiene tres genes que codifican supresores de silenciamiento. CP es supresor de silenciamiento intercelular, p23 supresor de silenciamiento intracelular y P20 supresor de silenciamiento en ambos niveles (Lu *et al.* 2004)

La clasificación de genotipos de CTV ha identificado dos grupos (Hilf *et al.*, 2005). El primer grupo denominado VT contiene aislamientos VT, B14, T30 y T3, el segundo grupo denominado T36, contiene aislamientos B83, B33 y T36. El grupo VT está compuesto por determinados subgrupos de aislamientos VT (*B370, B152, B1, B370, B59, B79, B219*), B14 (*B425, B211, B41*), T30 (*B213, B348, B270 – I, B2*) y un subgrupo de aislamientos T3. El grupo T36 tiene aislamientos B83, B33, T36 (*B183, B359, B358*). Esta clasificación fue propuesta con base en los patrones compartidos de los marcadores genéticos utilizados. Los aislamientos asignados al genotipo T30 tuvieron una mínima variabilidad en la secuencia de nucleótidos entre la secuencia de los marcadores K17 y POL. La variabilidad entre la secuencia de nucleótidos de los marcadores fue mayor para genotipos asignados al grupo T36.

El gen p23 codifica una proteína de 23 KDa, se localiza adyacente al extremo 3' del genoma de CTV. Este gen no tiene genes homólogos en otros closterovirus. P23 se acumula en niveles moderados respecto a otras proteínas virales (Pappu *et al.*, 1997), sin embargo el RNA subgenómico de p23 es el segundo más abundante en el RNA mensajero viral de los tejidos infectados (Hilf *et al.*, 1995; Navas – Castillo *et al.*, 1997) y se acumula más rápido que otros RNA sub genómicos en protoplastos infectados, lo que sugiere que p23 está involucrado en los primeros pasos para la replicación o transcripción (Navas – Castillo *et al.*, 1997). Cítricos transgénicos que expresan p23 de CTV exhiben sintomatología similar al de plantas infectadas (Ghorebel *et al.*, 2001) lo que demuestra que p23 se encuentra involucrado en el desarrollo de síntomas y probablemente juega un papel determinante en la patogenicidad de CTV.

La función del gen p23 de CTV es asociada al control de la acumulación asimétrica del número de hebras de RNA durante la replicación y es potencial determinante de la patogenicidad de CTV. La región 78 – 80 de p23 se muestra como un marcador útil para diferenciar grupos de aislamientos suaves, severos y atípicos. Los aislamientos suaves

tienen en la posición 78 – 80 de p23 Leu⁷⁹ y Lys⁸⁰; los aislamientos severos tienen Ser⁷⁹ y Arg⁸⁰ y los atípicos tienen Gly⁷⁸ (Sambade *et al.*, 2003)

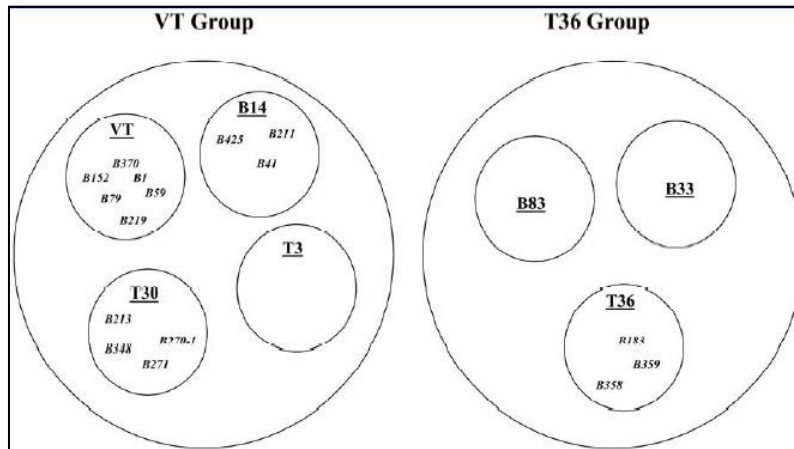


Figura 1-4: Clasificación de aislamientos de CTV propuesta por Hilf *et al.*, 2005

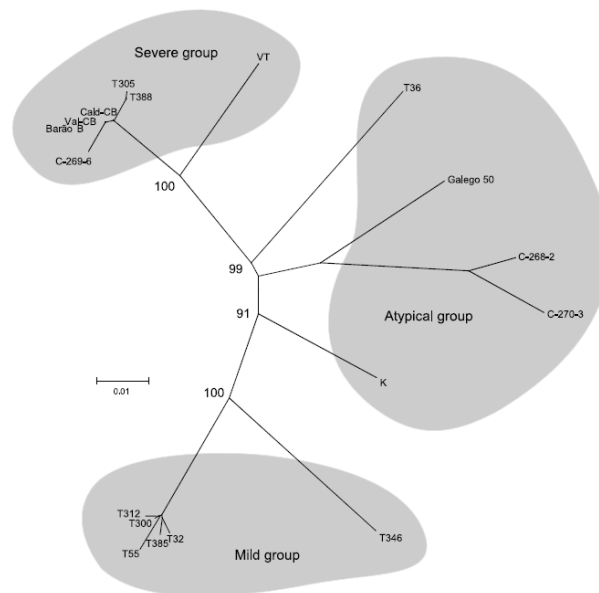


Figura 1-5: Clasificación de aislamientos de CTV propuesta por Sambade *et al.*, 2003.

1.2.2 Síntomas causados por CTV

Los virus que infectan plantas inducen la formación de diversas estructuras ó alteraciones en la célula que están en función de la replicación del genoma o del movimiento intracelular de estos. Se pueden formar esferulas, vesículas o cuerpos multivesiculares, que pueden estar conectados o no con el citoplasma. La especificidad en los organelos objetivo de los virus varía de acuerdo a la familia y genero (Laliberté *et*

al., 2010). Las proteínas virales de CTV forman inclusiones citoplasmáticas en las células del floema, estas inclusiones están asociadas con el aumento de número y tamaño de vacuolas, invaginación de la membrana nuclear y degradación de cloroplastos que ocasionan un desarrollo anormal y el colapso en general de las células (Rodríguez *et al.*, 2009; Ecale Zhou *et al.*, 2002).

La infección de CTV, se localiza en los conductos vasculares del floema de la planta, impidiendo el transporte de asimilados a través de estos (Bar Joseph, 1970). Al interior de las células acompañantes del floema, la cantidad de cuerpos de inclusión varía de acuerdo a la cepa del virus (Bar Joseph y Lee, 1989). Las infecciones por CTV descritas en las células del floema generan invaginaciones de la membrana nuclear y degradación de los cloroplastos (Ecale Zhou *et al.*, 2002).

La expresión sintomática de las plantas infectadas con CTV es variable y esta difiere de acuerdo a la interacción patrón – copa y al tipo de cepa viral que causó la infección (Bar Joseph, 1989). Sin embargo, los síntomas esenciales reportados en el mundo están asociados a decaimiento rápido (Quick decline - QD) de las especies cítricas injertadas sobre el patrón *C. aurantium* en donde se produce necrosis del floema en la unión del patrón y la copa. El segundo síntoma de importancia es la acanaladura de tallo (stem pitting - SP), en tallo y ramas de varias especies de cítricos, disminuyendo el vigor de la planta, el tamaño de los frutos y el rendimiento en producción sin tener en cuenta el patrón utilizado. El tercer síntoma está asociado a crecimiento retardado (stunting) y clorosis en las hojas reportado en patrones de *C. aurantium*, *C. limón* y *C. paradisi* Macf (Garnsey *et al.*, 1987; Sambade *et al.*, 2003). Los determinantes patogénicos de CTV aún no están estrictamente definidos, no es claro si los síntomas son inducidos por una variante genómica predominante o por una combinación de variantes genómicas de la población.

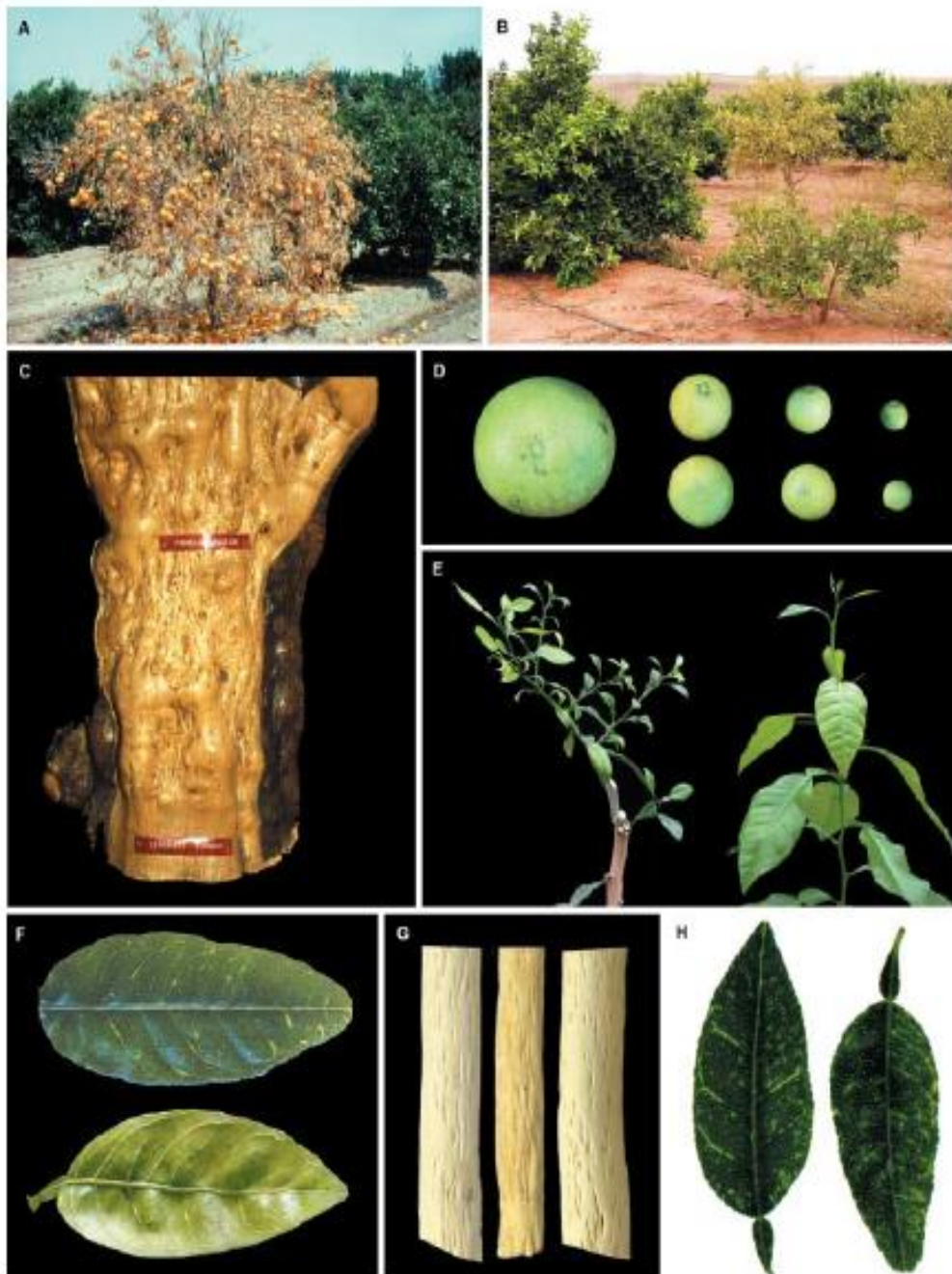


Figura 16: Síntomas causados por CTV. Tomado de Moreno *et al.*, 2008. a) Síntoma de decaimiento rápido en naranja dulce propagada sobre naranjo agrio. B) Árboles en diferente estado de declinamiento. c) Síntoma severo de stem pitting en el tronco de árbol de toronja injertado sobre *Poncirus trifoliata*. d) Fruto de toronja pequeños de árbol de toronja injertado sobre *Poncirus trifoliata*. e) Plantula con crecimiento retardado y hojas con clorosis. f) Clorosis en las nervaduras de hojas de *Citrus macrophylla*. g) Stem pitting en el tronco de plántulas de lima mejicana. h) Lima mejica transgénica expresando p23 (izquierda) y hoja de lima mejicana no transgénica infectada con CTV.

1.2.3 Transmisión

La evolución de los géneros de la familia closteroviridae está asociada con fuerzas de selección ejercidas por sus insectos vectores, resultando en tres linajes principales asociados a la transmisión de closterovirus por áfidos, crinivirus por moscablanca y ampeñovirus por cochinillas (Karasev, 2000). La transmisión de CTV es semipersistente y en plantas infectadas está dirigida a células asociadas al floema (Martelli *et al.* 2002). CTV tiene dos vías principales de transmisión. (1) por yemas para propagación infectadas con CTV, siendo este el responsable de la dispersión regional. (2) Vectores del género *Aphis* y del género *Toxoptera*, siendo los más reconocidos *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii* (Rocha-Peña *et al.* 1995). Los factores que influyen la dispersión en campo están relacionados con la densidad de población de áfidos, las condiciones ambientales que influyen la dinámica en las poblaciones de los vectores, los aislamientos virales predominantes en campo y la eficiencia de transmisión por cepas específicas como en el caso *T. citricida* que es el vector más eficiente de aislamientos severos (Bar Joseph y Lobstein 1972; Marroquin *et al.*, 2004; Hermoso de Mendoza *et al.*, 1984).

1.3 Hospedero: *Citrus latifolia* Tanaka (Lima Tahití)

El centro de origen de *Citrus latifolia* es desconocido, sin embargo se ha llegado a pensar que este es un híbrido entre lima mejicana (*Citrus aurantifolia*) y limón (*Citrus limón*). Este cítrico es de porte alto con hojas lanceoladas y pecíolos alados; sus frutos son ovales, oblongos o elípticos de piel verde y lisa que al madurar se torna amarilla, generalmente sin semilla, sus flores son ligeramente violetas y el polen es inviable. *C. latifolia* es altamente susceptible a CTV, a los aislamientos que inducen decaimiento rápido (QD) y los que inducen acanaladuras de tallo y ramas (SP). En los llanos orientales de Colombia los huertos de producción de lima Tahití reportan que estos no superan los ocho años de producción a consecuencia de las severas epidemias de tristeza de los cítricos (Mateus *et al.*, 2010).

Históricamente los patrones utilizados para lima Tahití han presentado dificultades por su susceptibilidad a la enfermedad tristeza de los cítricos y otros patógenos. En Colombia el patrón más utilizado para lima Tahití es Volkameriana (*C. volkameriana* Ten. Y Pasq.) no es susceptible a *Phytophthora*. sp y se reporta con niveles de tolerancia a CTV. Las

plantas injertadas sobre este patrón son vigorosas, uno de sus atractivos en lima Tahití es su precocidad, sin embargo una de las limitantes es el color verde pálido de sus frutos, que afecta la demanda de exportación. El patrón naranjo amargo (*C. aurantium* L.) y *C. macrophylla* son altamente productivos, pero altamente susceptibles a CTV, por tanto no son promisorios para zonas endémicas de CTV. En Brasil el limón rangpur (*C. limonia* Osbeck. (pro sp.)) es ampliamente usado como patrón para lima Tahití por su alta resistencia a la sequía, precocidad y alta productividad. El limón rugoso (*C. jambhiri* Lush), es susceptible a *Phytophthora*. sp y no es recomendable como patrón para lima Tahití. Los patrones tradicionales como limón rugoso (*C. jambhiri* Lush), naranjo agrio (*C. aurantium* L.) y naranjo dulce (*C. sinensis* [L.] Osb.) han sido poco utilizados en la citricultura colombiana y hoy día no tienen ningún uso debido a su susceptibilidad a problemas fitosanitarios, en especial a CTV y a gomosis. El patrón Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata* (L.)) es un híbrido intergenérico entre naranja dulce por naranja trifoliada, tolerante a enfermedades sistémicas, susceptible a *Citrus Exocortis Viroid*, ha mostrado gran potencial productivo en la zona cafetera de Colombia, no obstante, su comportamiento como patrón para lima Tahití no está bien determinado. Citrumelo Swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata* (L.) Raf.) es un híbrido intergenérico entre toronja por naranja trifoliada, tiene buen comportamiento en suelos ácidos para lima Tahití, en Brasil induce buenas productividades para lima Tahití y en Colombia supera en producción a algunos patrones injertados con madarina "Arrayana". El patrón cleopatra (*C. reticulata* Blanco.) es susceptible a deficiencias de micronutrientes, produce frutos pequeños y crece mejor en zonas tropicales que subtropicales, no es prometedor como patrón para lima Tahití (Campbell, 1979; Campbell 1991, Figueiredo *et al* 2001) En Colombia cleopatra ha sido un patrón evaluado para lima Tahití, los huertos evaluados por Hernandez y Parrado, 2008, se establecieron en 1997 y han alcanzado de manera gradual el 100% de incidencia. El síntoma más frecuente encontrado en campo es "stem pitting", no obstante en esta evaluación no fue posible corroborar el tipo de cepa presente en campo. Las cepas tipo VT están asociadas a este tipo de síntomas y de acuerdo al contexto es una cepa ampliamente distribuida y establecida en las zonas de producción de cítricos en Colombia. No obstante, algunos árboles del huerto empiezan a colapsar a partir del año 8 de establecimiento que podría ocurrir por los eventos de re-inoculación del virus por los vectores presentes en campo y el título viral, por la interacción entre varios tipos de cepas de CTV o por la compatibilidad presente entre el patrón cleopatra y lima Tahití.

En Venezuela los patrones cleopatra carrizo, volkameriano y citrumelo preliminarmente fueron catalogados como promisorios para injertarlos sobre Naranja valencia (*C. sinensis* (L.) Osbeck.) por su buen comportamiento frente a CTV (Mendt *et al.*, 1988). Aunque estas respuestas se dieron en una especie cítrica diferente a lima Tahití, las condiciones de suelos de Venezuela pueden ser homologables a los de algunas regiones de Colombia, como es el caso de los llanos orientales. Evaluaciones de patrones como carrizo, limón volkameriano y cleopatra no presentan efectos sobre la productividad y calidad de los frutos, sin embargo si hay disminución de la longevidad; de las plantas injertadas sobre limón rugoso colapsan alrededor del año 5 debido a pudriciones de raíz; las plantas de lima Tahití injertadas sobre mandarina cleopatra colapsan entre los años 5 y 8 probablemente debido a una baja afinidad entre el patrón cleopatra y lima Tahití (Stenzel y Neves 2004; Figueiredo *et al.* 2007). No obstante en este último no se tuvo en cuenta la influencia de CTV sobre la baja longevidad de estos materiales. Una situación similar es reportada para lima Tahití injertada sobre el patrón cleopatra, en la cual se reporta que la longevidad se limita hasta el año 8 y se atribuye esta situación a problemas fitosanitarios como CTV (Quiroga *et al.*, 2010). Las selecciones de *Poncirus trifoliata* dentro de las cuales se encuentra el patrón kryder son tolerantes a enfermedades sistémicas con *Citrus Tristeza Virus*, *Citrus psorosis virus* y *Phytophthora*; presenta problemas de adaptación a suelos salinos y susceptible a *exocortis*, en lima Tahití presenta porte bajo y menor volumen de la copa. Una de sus selecciones fly dragon (*P. trifoliata* var *monstrosa*) es un patrón enanizante que induce porte bajo en general y se referencia como tolerante a *Phytophthora*, SP-CTV y nematodos, pero susceptible a *Citrus exocortis viroid* (Sanches-Stuchi, 2007). El patrón Sunki x English es un híbrido entre la naranja trifoliada y la mandarina "Sunki" (*P. trifoliata* English x *C. sunki*), es el patrón con mayor resistencia *Phytophthora* de 90 patrones evaluados en el Valle del Cauca en la década de 1960, en Colombia ha alcanzado un alto reconocimiento por alcanzar altas producciones injertado sobre naranja "García Valencia" en la zona cafetera y en mandarina "Oneco"; forma plantas de porte medio, alta calidad de frutos y sanidad de la planta (Orduz-Rodríguez, 2012). Mandarina cleopatra (*Citrus reshi* Hort. Ex Tan.) es el patrón cítrico más utilizado a nivel mundial, es poco precoz para entrada en producción, produce frutos de buena calidad, es tolerante a algunas cepas de *Citrus Tristeza Virus*, *Citrus psorosis virus*, *Citrus exocortis viroid*.

1.4 Bibliografía

Albiach-Marti, M R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyaranayana, T., Shanker, M.E., Almira, E.C., Vives, M.C., López, C., Guerri, J., Florez, R., Moreno, P., Garnsey, S., M., Dawson, W.O. 2000. Sequences of *Citrus Tristeza Virus* separated in time and space are essentially identical. *J. Virol.* 74, 6856- 6865.

Bar – Joseph y Lee, R. Descriptions of plant viruses. 1989. AAB.

Bar-Joseph, M. Lobenstein, G. Cohen, J. (1970) Partial purification of viruslike particles associated with the citrus trsiteza virus. *Phytopathology* 60: 75-78

Bar Joseph.M y Loebenstein. G .1972. Effects os strain, source plant, and temperatura on the transmissibility of *Citrus Tristeza Virus* by melón aphid. *Phytopathology* 63: 716 – 720.

Bar-Joseph, M.; Marcus, R.; Lee, R.F. (1989) The continuous challenge of *Citrus Tristeza Virus* control. *Annual Review of Phytopathology* 27, 291-316.

Campbell, C.W. 1979. Tahití lime production in Florida. University of Florida. Florida Cooperative. Service, EVA.

Campbell, C.W. 1991. Production of the lime (*Citrus latifolia*, Tanaka). In florida. University of Florida. Tropical Region 2:184-192.

CMI (1978) *Distribution Maps of Plant Diseases* No. 289 (edition 5). CAB International, Wallingford, UK.

Davino, S., Davino, M., Sambade, A., Guardo, M. and Caruso, A.(2003) The first *Citrus Tristeza Virus* outbreak found in a relevant citrus producing area of Sicily, Italy. *Plant Dis.* 87, 314.

Ecale Zhou, C.L., Ammar, E. D., Sheta, H., Kelley, S., Polek, M., Ullman, D.E. 2002 *Citrus Tristeza Virus* ultraestructure and associated cytopathology in *Citrus sinensis* and *Citrus aurantifolia* *Canadian Journal of Botany* 80:512-525

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

Figueiredo, J.O., Stuchi, E.S., Laranjeira, F.F., Donadio, I.C., Teófilo-Sobrinho, J., Sempionato, O.R. y Muller, G.W. 2001. Porta-enxertos para lima ácida 'Tahití' em duas regiões do Estado de São Paulo. *Laranja*, v.22, n.1, p.203- 213.

Garnsey, S. M., D. J. Gumpf, C. N. Roistacher, E. L. Civerolo, R. F. Lee, R. K. Yokomi, and M. BarJoseph 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytophylactica* 19: 151-157.

Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Hilf, M.E., Matos, L. and Borbón, J. (2000) Emergence and spread of severe strains of *Citrus Tristeza Virus* isolates in the Dominican Republic. In: Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (da Graça, J.V., Lee, R.F. and Yokomi, R. K., eds), pp. 57–68. Riverside, CA: IOCV.

Granof, A., y Webster, R. 1999. Encyclopedia of Virology. Second Edition, Vol 2. Academic Press.

Ghorbel, R., Lopez, C., Fagoaga, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R., y Peña, L. 2001. Transgenic citrus expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit viral-like symptoms. *Molecular plant pathology* (2001) 2(1), 27 – 36

Hermoso de Mendoza, A., Ballester-Olmos, J.F. and Pina, J.A. (1984) Transmission of *Citrus Tristeza Virus* by aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain. In: Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Garnsey, S.M., Timmer, L.W. and Dodds, J.A., eds), pp. 23–27. Riverside, CA: IOCV.

Hernandez, F., y Quiroga, J. 2008. Análisis de la influencia del virus de la tristeza de los cítricos CTV, en copas de lima tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertadas sobre patrón de mandarina cleopatra (*Citrus reshni* hort. ex tan), en Corpoica, La Libertad. Tesis. Escuela de Ingeniería Agronómica. Universidad de los Llanos. Villavicencio – Colombia.

Hilf, M. E and Garnsey, S. M. 2000. Characterization and Classification of *Citrus Tristeza Virus* Isolates by Amplification of Multiple Molecular Markers. Fourteenth IOCV Conference, 2000—*Citrus Tristeza Virus*

Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L. and Garnsey, S.M. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, 208, 576–582.

Hilf, M. E., Mavrodieva, V. A., and Garnsey, S. M. 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. y Lister, C.A. (1949) Lime disease in the Gold Coast. *Nature* 164, 880

Karasev AV, Boyko VP, Gowda S, Nikolaeva OV, Hilf ME, Koonin EV, Niblett CL, Cline K, Gumpf DJ, Lee RF, Garnsey SM and Dawson WO (1995) Complete sequence of the *Citrus Tristeza Virus* RNA genome. *Virology* 208, 511–520.

Karasev, A.V. (2000). Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev.*

*Phytopathol.*38, 293-324.

Laliberté, J.F., Sanfacon, H. 2010 Cellular remodeling during plant virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48:69-9.

Lu, R., Folimonov.. M., Shinatahu. M., Li, W., Dawson., Ding .S. 2004. *Proc. Natl. Acad.*

Mateus, D., Pulido, X., Gutierrez, A., y Orduz-Rodriguez, J.O. 2010. Evaluación económica de la producción de cítricos cultivados en el Piedemonte del Departamento del Meta durante 12 años. *Orinoquia* [online]. 2010, vol.14, n.1.

Marroquin, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martinez, C., Carbonell, E.A., Hermoso de Mendoza, A., and Cambra, M. (2004). Estimation of the number of aphids carrying *Citrus Tristeza Virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*.

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

Mendt, R., F. Ochoa, L. Vilalba, H. Uhlig, G. Perez, A. Cedeno, and T. Barreto 1988. Evaluation of citrus tristeza virus tolerant rootstocks grafted with Valencia orange in Venezuela, p. 107-112. In: *Proc. 10th Conf. IOCV., IOCV, Riverside.*

Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Pena, L., 2008. Citrus tristezavirus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.*9, 251–268.

Navas – Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Godwa, S., Hilf, M.E., Garsney, SM., y Dawson, W.O. (1997) Kinetics of accumulation of citrus trsiteza virus RNAs. *Virology* , 199, 25 – 46.

Oberholzer, P.C.J.; Mattews, I.; Stiemie, S.F. (1949) The decline of grapefruit trees in South Africa. A preliminary report on so-called "stem pitting". *Science Bulletin of the Department of Agriculture South Africa No. 297.*

Orduz-Rodriguez, J.O. 2012. Manual para el Cultivo de Frutales en el Trópico. Capitulo cítricos. Editorial Produmedios

Pappu, S.S., Febres, V.V., Pappu, H.R., Lee, R.F. and Niblett, C.L. (1997) Characterization of the 3' proximal gene of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virus Res.* 47, 51–57.

Quiroga - Cardona, Julio., Hernández- Parrado, F. L., Silva- Herrera, M., Orduz-Rodríguez, J.O. 2010. Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de Mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la

influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones del piedemonte del Meta, 1997-2008. Orinoquia, vol. 14, núm. 1, junio, 2010, pp. 5-15

Rodriguez, P., De Perez, G., Guzman, M., 2009. Detección del virus de la tristeza de los cítricos por serología, microscopía e hibridación in situ. Revista Colombiana De Biotecnología ISSN: 0123-3475 ed: Instituto De Biotecnología v.11 fasc.1 p.94 – 106.

Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa, F.M., Garnsey, S.M., and Yokomi, R.K. (1995). *Citrus Tristeza Virus* and its aphid vector Toxóptera citricida: Threats to citrus production. *Plant Disease* 79, 437-445.

Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., and Ambrós, S. 2009. Discrimination between mild and severe *Citrus Tristeza Virus* isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* 99:307-315.

Sambade, A., Lopez, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., Moreno, G. 2003. Polymorphism of a specific región in gen p23 of *Citrus Tristeza Virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* 148: 2325 – 2340.

Sanches-Stuchi, E. 2007. Trifoliata Flying Dragon: Um excelente porta-enxerto para limão Tahit. Em memória Congresso Embrapa Mandioca e fruticultura Tropical-Estacao experimental de citricultura de Bebedouro. :8-10.

Stenzel, Neusa. M.C., y Neves. C. (2004) Rootstocks for 'Tahití ' lime. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* [online]. 2004, vol.61, n.2, pp. 151-155. ISSN 0103-9016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000200005>

Suastika, G., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H. and Okuda, S.(2001) Nucleotide sequence of *Citrus Tristeza Virus* seedling yellows isolate. *J. Gen. Plant Pathol.* 67, 73–77.

Tatineni, S., Robertson, C., Garnsey, S., y Dawson, W. 2011. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Oct 18;108(42):17366-71. Epub 2011 Oct 10.

Vives, M.C., Rubio, L., López,C., Navas-Castillo, J., Albiach-Marti, M.R., Dawson, W.O. Guerri, J., Florez , R., Moreno, P. (1999). The complete genome sequence of the major component of a mild *Citrus Tristeza Virus* isolate. *J. Gen. Virol.* 80, 811-816.

Webber, H.J. 1943. The Tristeza Disease of Sour-Orange-Rootstock. *Proc. Am.Soc.Hort.Sci.* 43:160-168.

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.

2. Identificación de cepas de *Citrus Tristeza Virus* mediante marcadores moleculares de genotipo específico en plantas de *Citrus latifolia* (Tanaka).

Resumen

Citrus Tristeza Virus (CTV) es causa de la enfermedad viral más deletérea para la producción de cítricos a nivel mundial, y usualmente está presente en campo como un complejo de asilamientos. En este trabajo se identificaron cepas de CTV en dos parcelas experimentales de lima Tahití generadas por micro-injerto de ápices caulinares *in vitro* sobre seis patrones diferentes. Las parcelas se establecieron en los centros de investigación de Corpoica Nataima (Espinal – Tolima - Colombia) y La Libertad (Villavicencio – Meta – Colombia). El material se evaluó después de dos años de crecimiento en campo. Se empleó RT-PCR mediante primers del gen de la polimerasa que permiten la identificación de los genotipos específicos VT, T30 y T36, y primers del gen p23 para discriminar cepas de los grupos suaves y severos. El genotipo VT fue de mayor incidencia en las dos localidades, mientras que el genotipo T30 se encontró en las dos localidades pero con menor incidencia en La Libertad. El genotipo T36 se encontró únicamente en la Libertad. Se identificaron plantas con infecciones mixtas VT/T30 y VT/T30/T36. Las secuencias nucleotídicas del gen POL corroboraron los resultados obtenidos por RT-PCR, así los aislamientos colombianos T36 presentaron 99% de identidad con la secuencia del genoma de T36 registrada en el GeneBank. Sin embargo, se sugiere corroborar la presencia de este genotipo mediante el uso de marcadores moleculares de otros genes de CTV.

Abstract

Citrus Tristeza Virus (CTV) is the most damaging virus of citrus in the worldwide. Usually, it is present in field trees as a complex of isolates. In this study, CTV isolates were

identified in two experimental tahitian lime plots produced by micro-grafting of caulinar budwood *in vitro* on six different rootstocks. Plots were established in research centers of Nataima (Espinal – Tolima – Colombia) and La Libertad (Villavicencio – Meta – Colombia). The material was evaluated after two years of established crops. RT-PCR was done using gene polymerase specific molecular markers to identify genotypes VT, T30 and T36 and gene p23 markers to identify mild and severe isolates. Isolates of severe genotype VT exhibited de higher incidence in the two localities, mean while the isolates of the mild genotype T30 were found in two localities with less incidence in La Libertad. Severe genotype T36 was found in La Libertad. Mixed infections VT/T30 and VT/T30/T36 were identified. Nucleotide sequences of gene polymerase of isolates identified as genotypes VT, T30 and T36 corroborated the obtained results by RT-PCR. Isolates with genotype T36 showed 99% identity with the genome sequence T36. However, this result must be confirmed using molecular markers for other genes of CTV.

2.1 Introducción

El agente causal de la tristeza de los cítricos es *Citrus Tristeza Virus* (CTV), se encuentra establecido en todas las áreas de producción y es considerado como el virus más limitante en la producción mundial de cítricos. CTV pertenece al género *Closterovirus* de la familia *Closteroviridae*. Las partículas virales son filamentos flexuosos de 10 a 11 nm de diámetro y 1900 a 2000 nm de longitud, y exhiben una arquitectura particular “rattlesnake” por el ensamblaje de dos proteínas de capsido, CP de 25kD y CPM de 27kD (Febres *et al.*, 1996). El genoma de CTV es RNA de cadena sencilla con sentido positivo (Bar Joseph *et al.* 1972; Bar Joseph y Lee, 1989). Existen una amplia gama de técnicas para detección de CTV, siendo las más frecuentes ELISA, RT-PCR y RT-qPCR. Mediante ELISA se utilizan anticuerpos monoclonales y policlonales para discriminar entre cepas suaves y severas (Garnsey *et al.*, 1978; Gonsalves, *et al.*, 1978; Peñaranda *et al.*, 1996). Las técnicas moleculares emplean el uso de marcadores específicos para discriminar el genotipo de las diferentes cepas de CTV. Algunos trabajos han conjugado la aplicación de técnicas de inmunopresión, serológicas y moleculares para el rápido diagnóstico de CTV (Rodríguez *et al.*, 2009).

La variabilidad en la expresión de síntomas es utilizada para diferenciar cepas de CTV. Las cepas suaves hacen referencia a que solo causan síntomas suaves o son

asintomáticos en el hospedero cítrico indicador. Las cepas severas pueden causar síntomas de “quick decline”, “stem pitting” o ambos, estos pueden variar en la intensidad (Garnesey *et al.*, 1987).

El RNA genómico (gRNA) de CTV se encuentra compuesto por 12 marcos de lectura abiertos (ORFs) y regiones no traducibles (UTRs) en las terminaciones 5' y 3'. El primer ORF se encuentra dividido por dos regiones 1a y 1b. 1a codifica replicasas. 1b codifica RNA polimerasa dependiente de RNA. Estas dos ORFs abarcan la mitad 5' del genoma y son traducidos directamente por el gRNA. En la mitad 3' se encuentran ubicados 10 ORF que codifican las proteínas p33 (ORF2), p6 (ORF 3), p65– hHSP70 (ORF 4), p61 (ORF 5), p27- CPm (ORF 6), p25 – CP (ORF 7), p18 (ORF 8), p13 (ORF 9), p20 (ORF 10) y p23 (ORF 11). p65 y p62 son homologas a proteínas de choque térmico y junto con las proteínas de la capsida p25 y p27 están involucradas con el ensamblaje del virion. p20 es asociada con la acumulación de cuerpos de inclusión en las células infectadas. La función de p33, p18 y p13 se relaciona con la capacidad de inducir infección sistémica en el rango de cítricos hospederos (Tatineni *et al.*, 2011) y se ha demostrado que no son necesarias para la replicación y ensamblaje de los viriones (Satyanarayana *et al.*, 1999, 2000). Los ORFs del extremo 3' de CTV se expresan a través de un set de RNAs mensajeros 3'- coterminales llamados RNAs subgenómicos (Hilf *et al.*, 1995). Una alta variabilidad ha sido encontrada en CTV, debido a que la RNA polimerasa dependiente de RNA - dRpR no posee actividad exonucleasa para corrección de errores en la replicación y a eventos de recombinación (Bar-joseph *et al.*, 1893; Moreno *et a.*, 2008; Cerni *et al.*, 2007). Análisis de secuencias de nucleótidos muestran que el genoma de CTV es conservado en los ORF cercanos al extremo 3' con una identidad del 90% entre aislamientos y con mayor divergencia en los ORFs 1a y 1b cercanos al extremo 5' con una identidad del 40% entre aislamientos (Albiachi *et al.*, 2000; López *et al.*, 1998; Mawassi *et al.*, 1996).

La detección de un genotipo específico de CTV es posible mediante PCR con primers diseñados a partir de variantes nucleotídicas del gen RNA polimerasa (Hilf *et al.*, 2005). A partir de este método de detección, CTV ha sido clasificados en tres grupos principales: VT (B370, B152, B1, B79, B59, B219) que generan síntomas de acanaladuras de tallo y ramas, T30 (B213, B348, B271, B270-1) que generan síntomas suaves, y T36 (B83, B33,

T36) que generan decaimiento rápido (Hilf *et al.*, 1999; Hilf y Garnsney 2000; Hilf *et al.*, 2005). Por otro lado marcadores específicos diseñados a partir del polimorfismo del gen p23 permiten discriminar genotipos severos (VT, Barão B, T 305, T388), suaves (T300, T312, T32, entre otros) y atípicos (T36, Galego 50, K, entre otros) (Sambade *et al.*, 2003).

Trabajos de caracterización de cepas colombianas de CTV reportan la presencia de suaves y severas. Las cepas B126 y B165 de Colombia están relacionadas con aislamientos que generan acanaladuras de tallo y en análisis filogenéticos muestran relación con aislamientos de India y Japón. Las cepas B272 y B274 están asociadas con aislamientos suaves T4 y T30 de Florida. La comparación de secuencias del gen CP de algunas cepas colombianas con la secuencia del aislamiento T36 indicó rangos de identidad de 93% a 97% (Peñaranda *et al.*, 1996). Este estudio preliminar sugirió la presencia de cepas T36 en cultivos colombianos, sin embargo esta región del genoma de CTV es altamente conservada y es necesario evaluar otros marcadores moleculares para CTV que proporcionen mayor información. Los trabajos de detección en Colombia indican una amplia distribución y una alta incidencia de CTV en general. El uso de técnicas serológicas ó moleculares para discriminar cepas suaves de severas, han determinado una amplia distribución de cepas severas que generan acanaladuras de tallo (Peñaranda *et al.*, 1996; Oliveros *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2004; Martínez y Guzmán 2007), la distribución de cepas suaves es menos amplia y se reportan principalmente en Mompóx (Peñaranda *et al.*, 1996). El objetivo del presente trabajo fue identificar las cepas de CTV que infectan dos poblaciones de lima Tahití ubicadas en dos posiciones geográficas diferentes.

2.2 Materiales y métodos

Las muestras se colectaron del centro de investigación Corpoica Nataima, en el Espinal (Tolima – Colombia) ubicado en las coordenadas 4° 12' 56" N y 72° 56' 3" O, a 430 msnm, con una temperatura media de 28 °C y una humedad relativa del 70% y del centro de investigación Corpoica La Libertad a 2 Km de Villavicencio (Meta –Colombia) ubicado en las coordenadas 9° 6' N, 73° 34' O, a 320 msnm, con una temperatura media de 27 °C y humedad relativa entre el 70 y el 90%. Cada una de las poblaciones de lima Tahití se encontraba injertada sobre patrones de seis especies o cultivares híbridos: volkameriano

(*C. volkameriana* Ten. Y Pasq.), citrumelo swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata* (L.) Raf.), mandarina cleopatra (*C. reticulata* Blanco.), sunky x english (*Citrus sunki* Hort. ex Tan. x *Poncirus trifoliata* (L.)), kryder (*Poncirus trifoliata* L Raf), y carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata* (L.)). En campo, cada especie de injerto se distribuyó en grupos de seis plantas y este arreglo se repitió cuatro veces. Las muestras se rotularon de acuerdo al patrón, número de repetición y número de planta. Se procesaron de la siguiente manera: **i)** Se tomaron nervaduras de hojas jóvenes y corteza de ramas con tejido verde en los cuatro puntos cardinales de cada una de las plantas. **ii)** Se homogenizó en una sola muestra cada grupo de seis plantas injertadas sobre un mismo patrón. **iii)** El material vegetal se macero en nitrógeno líquido **iv)** Cada grupo de plantas se procesó por RT – PCR. **iv)** En los grupos de plantas en los que se detectaron cepas de interés ó varias cepas, se procesó independientemente cada planta (ver figura 1)

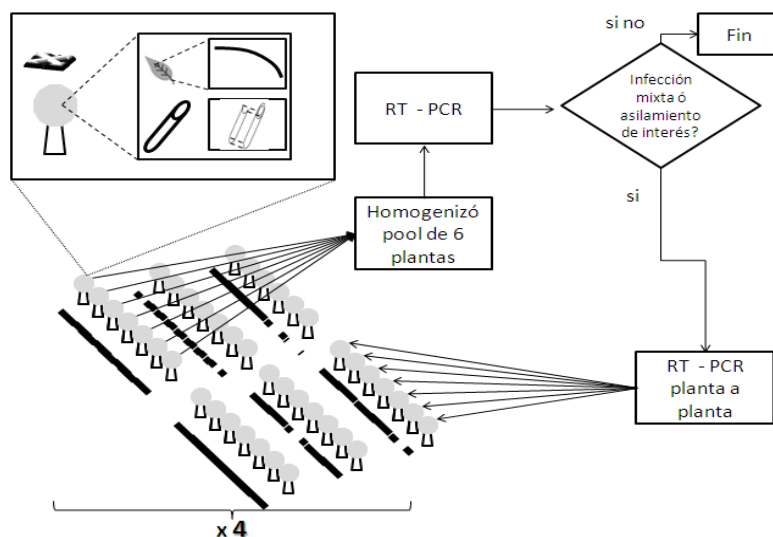


Figura 2-1: Esquema de toma de muestras y flujo de decisión para seleccionar plantas a evaluar

El genotipo de cada uno de las cepas de CTV se determinó por RT – PCR mediante el uso de parejas primers genotipo específicos para VT, T30 y T36. Los productos RT-PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los productos de RT – PCR fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se compararon con las registradas en el GeneBank. La RT – PCR se realizó en un termociclador BIORAD C1000.

2.2.1 Extracción de ARN, transcripción reversa (RT) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La extracción de ARN se realizó mediante el protocolo Trizol® (Invitrogen). Este consistió en tres fases: la primera rompimiento de paredes celulares con Trizol®, separación con cloroformo y gradientes de densidad por centrifugación. La segunda fase fue de precipitación de ácidos nucleicos mediante el uso de alcohol isopropílico y gradientes de densidad por centrifugación. La tercera fase consistió en el lavado del pellet de ARN con etanol al 75%. Posteriormente se re suspendió el pellet en 50µl de agua grado molecular tratada con dietil pirocarbonato (DEPC).

Transcripción reversa

Se realizó en un volumen de 25µl que contenía 5µl de RNA, 1µl del primer random hexamers (Invitrogen), 1µl de dNTPs 10mM (Invitrogen) y 8µl de agua DEPC, 2µl de Buffer first strand M-MLV 10X (Invitrogen), 2µl de DTT 100mM (Invitrogen), 1µl RNAasa Out 40U (Invitrogen), 1µl de M-MLV-RT (Invitrogen) y 4µl de MgCl₂ 25mM (Invitrogen). El RNA se denaturó a 65 °C por 5 minutos. La reacción se incubó 10 minutos a 25 °C, se sintetizó por 90 minutos a 37 °C, y se finalizó 10 minutos a 72 °C.

PCR Convencional

La PCR convencional se realizó con los primers de la región polimerasa en reacciones de 25µl. Cada una contenía 2.5µl de Buffer taq polimerasa 10X sin MgCl₂ (Invitrogen), 1µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 0.25µl 10 mM primer sentido, 0.25µl 10 mM anti – sentido de los primers CP, VT-POL, T30POL y T36POL según el caso; 1.5µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 5µl de producto de RT. 0.4µl de *Taq* polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 14.1µl de agua DEPC. El programa de amplificación consistió en una temperatura de denaturación inicial por 5 minutos a 94 °C, posteriormente 35 ciclos a 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos y 72 °C por 60 segundos. Para finalizar una temperatura de extensión a 72 °C por 10 minutos.

La amplificación con primers CP indica la presencia general de CTV y es un control interno de la transcripción reversa. Los primers VT-POL producen un amplicon de 695pb e indica la presencia de genotipos severos VT que ocasionan acanaladuras de tallo en lima Tahití. Los primers T30-POL producen un amplicon de 696pb e indica la presencia

de genotipos que ocasionan síntomas suaves en lima Tahití. Mientras que los primers T36-POL permiten la amplificación de un amplicon de 714pb e indica la presencia de cepas T36 que ocasionan decaimiento rápido en cítricos injertados sobre naranjo agrio y lima Tahití (Hilf *et al.* 2005)

PCR bidireccional

Esta PCR se efectuó mediante el uso de primers del ORF p23. Se utilizaron dos parejas de primers; una pareja externa y una interna. La reacción se realizó a 25µl. Cada una contenía 2.5µl de Buffer taq polimerasa 10X sin MgCl₂ (Invitrogen), 1µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen), Los primers externos (0.25µl 10 mM primer pm85 (+), 0.25µl 10 mM primer pm86 (-)), los primers internos (0.25µl 10 mM primer pm82 (+), 0.25µl 10 mM primer pm83 (-)), 1.5µl de MgCl₂ 50mM (Invitrogen), 5µl de producto de RT. 0.4µl de taq polimerasa 5U/µl (Invitrogen) y 14.1µl de agua DEPC. . El programa de amplificación consistió en una temperatura de denaturación inicial por 94 °C por 120 segundos, posteriormente 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos y 72 °C por 60 segundos. Para finalizar una temperatura de extensión a 72 °C por 120 segundos.

Los primer externos están basados en secuencias conservadas y los internos son derivados de secuencias de grupos severos, suaves y atípicos. Los grupos suaves (T32, T35, T300, T312, T346 y T385) producen amplicones de 612 y 239 a la vez. Los grupos severos (VT y Barão B) producen amplicones de 612 y 450 pb a la vez; otras cepas del grupo severo (T305, T388, C269-6, Cald-CB y Val-CB) producen adicionalmente un fragmento de 239 pb. Los grupos atípicos (T36 y K) producen un solo amplicon de 612 pb. (Sambade *et al.* 2003)

Primer	Secuencia
VTPOL (+)	gacgctagc gatggtcaagc
VTPOL (-)	ctcggctcgttcttacgt
T36POL (+)	atggacgacgaaacaaagaaattg
T36POL (-)	tcaacgtgtgtgaattcca
T30POL (+)	gatgctagc gatggtcaaat
T30POL (-)	ctcagctcgttctcacat
P23_PM82	aaacacgataaggcatcgag
P23_PM83	cacttacgttcagtcttgagcg
P23_PM85	ggacaaacttiittctgtgaaccttc
P23_PM86	gatgaagtgggttcacggagaactc

Tabla 2-1: Primers de utilizados para detección de CTV. Tomado de Hilf *et al.*, 2005 y Sambade *et al.*, 2003

Secuenciación

Los productos de PCR previamente purificados fueron secuenciados en un secuenciador ABI3730 XL por el método Big Dye Terminator. Dos productos de PCR obtenidos con los primers utilizados de la región de polimerasa para cada una de las poblaciones evaluadas, fueron seleccionados para su secuenciación.

2.3 Resultados

Todos los grupos de muestras evaluados mediante PCR con primers del gen CP indicaron infección con CTV. En el 100% de las muestras se observaron amplicones 672pb que corresponden al tamaño esperado para este amplicon. Lo que indicó que por lo menos una de las seis plantas que conforman cada grupo, estaba infectada con CTV.

En la población del huerto de cítricos de La Libertad (Villavicencio – Meta – Colombia) se encontró una alta incidencia de cepas VT respecto a las cepas T30 y T36. El 100% de los grupos de plantas evaluadas estaban infectadas con cepas VT. El 8 % de los grupos de plantas evaluadas con el marcador estaban infectadas con cepas T30. El 13 % de los grupos de plantas evaluadas con cepas T36. Lo anterior constituye evidencia de infecciones mixtas VT/T30/T36 y VT/T30, las cuales fueron detectadas en los grupos de plantas injertadas sobre los patrones Volkameriano RI, Cleopatra RIII, Cleopatra RIV y carrizo RIV. Este resultado, llevó a evaluar la infección de estos grupos planta a planta.

En la reevaluación planta a planta se encontró que todas las plantas estaban infectadas con CTV, y de igual manera se encontró alta incidencia de cepas VT respecto a cepas T30 y T36. El 100% de las plantas estaban infectadas con cepas VT. Se identificaron plantas con infecciones mixtas, el 27% (6 plantas) tenían infección mixta entre cepas VT/T30, el 34% (8 plantas) de las plantas se encontraban infectadas con mezcla VT/T36 y el 4% (1 planta) tenía infección mixta entre cepas VT/T30/T36. El 35% de plantas restantes estaba infectado únicamente con cepas VT.

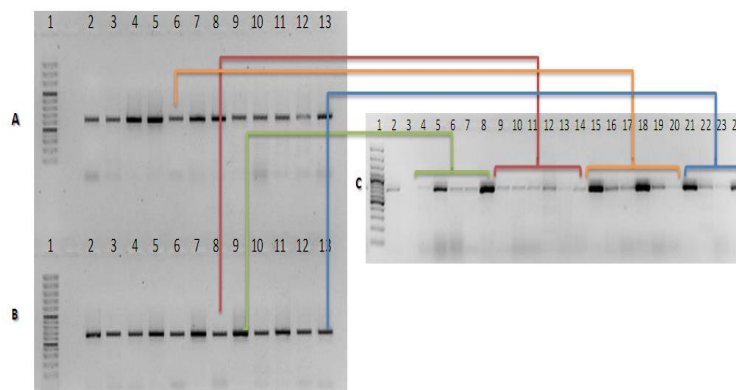


Figura 2-2: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones de VT-POL deCTV (695 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto Corpoica La Libertad. Las filas A y B muestran los productos de PCR de "pools" de seis plantas injertadas sobre cada patrón. **Fila A:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas). Carril 2 a 5: Kryder RI a RIV. Carril 6 a 9: Volkameriano RI a RIV. Carril 10 a 13: Sunky x English RI a RIV. **Fila B:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas). Carril 2 a 5: Citrumelo RI a RIV. Carril 6 a 9: Cleopatra RI a RIV. Carril 10 a 13: Carrizo RI a RIV. **Fila C:** Productos de PCR de cada planta de un pool de seis plantas. Carril 1: Marcador de peso molecular 100 bp (Fermentas). Carril 2: Control positivo Carril 3: Blanco de reacción. Carril 4 a 8: Cleopatra RIV plantas 1 a 5. Carril 9 a 14: Cleopatra RIII plantas 1 a 6. Carril 15 a 20: Volkameriano RI plantas 1 a 6. Carril 21 a 24: Carrizo RIV plantas 1 a 4.

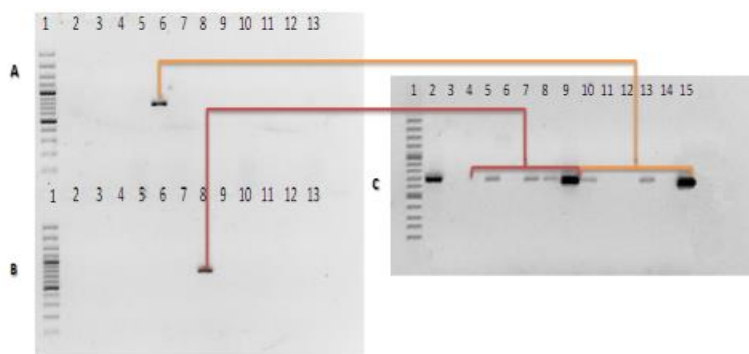


Figura 2-3: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones T30 POL deCTV (696 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad. Las filas A y B muestran los productos de PCR de "pools" de seis plantas injertadas sobre cada patrón. **Fila A:** Carril 1: Marcador de peso molecular Fermentas 100pb. Carril 2 a 5: Kryder RI a RIV. Carril 6 a 9: Volkameriano RI a RIV. Carril 10 a 13: Sunky x English RI a RIV. **Fila B:** Carril 1: Marcador de peso molecular Fermentas. Carril 2 a 5: CitrumeloRI a RIV. Carril 6 a 9: Cleopatra RI a RIV. Carril 10 a 13: Carrizo RI a RIV. **Fila C:** Las filas A y B muestran los productos de PCR de "pools" de seis plantas injertadas sobre cada patrón Carril 1: Marcador de peso molecular Fermentas 100pb. Carril 2: Control positivo Carril 3: Blanco de reacción. Carril 4 a 9: Cleopatra RIII plantas 1 a 6. Carril 10 a 15: Volkameriano RI Plantas 1 a 6

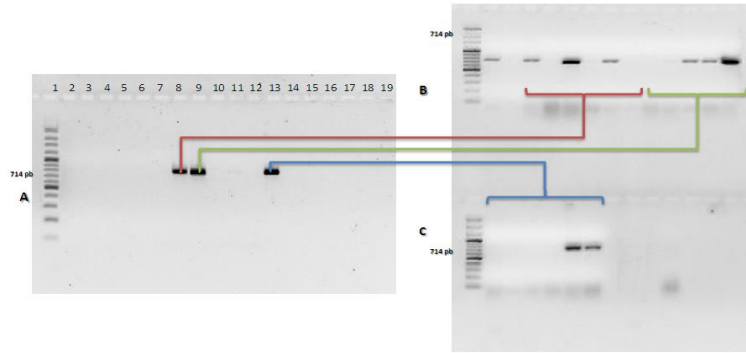


Figura 2-4: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones T36 POL de CTV (714 pb) de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad. La fila A muestra los productos de PCR de “pools” de seis plantas injertadas sobre cada patrón. **Fila A:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carril 2 a 5: Citrumelo RI a RIV. Carril 6 a 9: Cleopatra RI a RIV. Carril 10 a 13: Carihizo RI a RIV. Carril 14 a 17: Sunky x English RI a RIV. Carril 18 a 19: Cleopatra RI a RII. Las filas B y C muestran productos de PCR de cada planta de un pool de seis plantas **Fila B.** Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Carril 2: Control positivo Carril 3: Blanco de reacción Carril 4 a 9: Cleopatra RIII plantas 1 a 6. Carril 10 a 14: Cleopatra RIV plantas 1 a 5. **Fila C.** Carril 1: Marcador de peso molecular Fermentas. Carril 2 a 7: Carrizo RIV plata 1 a 6

Cada grupo de muestras se evaluó nuevamente con los primers de la región p23. Se visualizaron amplicones de 612pb y 412pb en el 96% de las muestras, indicando que estos grupos de plantas estaban infectados con cepas severas que podrían ser tipo VT. El 4% de las muestras restantes produjo adicionalmente una banda de 239pb, lo que indicaría que estos grupos de muestras podrían estar infectados en mezcla de cepas severas y suaves. Estas dos bandas adicionales se identificaron en los grupos de plantas volkameriano RI y cleopatra RIII. Se revaluaron estos grupos planta a planta más los grupos cleopatra RIV y carrizo RIV en donde no se había identificado cepas suaves con los primers de la región de polimerasa.

En la revaluación planta a planta en el 73% de las muestras se visualizaron únicamente amplicones de 612pb y 412pb, lo que indica que estas plantas estaban infectadas con asilamientos severos presumiblemente VT. En el 27% de las muestras se observó un amplicon adicional de 239pb, lo que indicó que estas plantas se encontraban infectadas con mezcla de cepas suaves y severas, esto en correspondencia a lo encontrado con los primers de la región polimerasa.

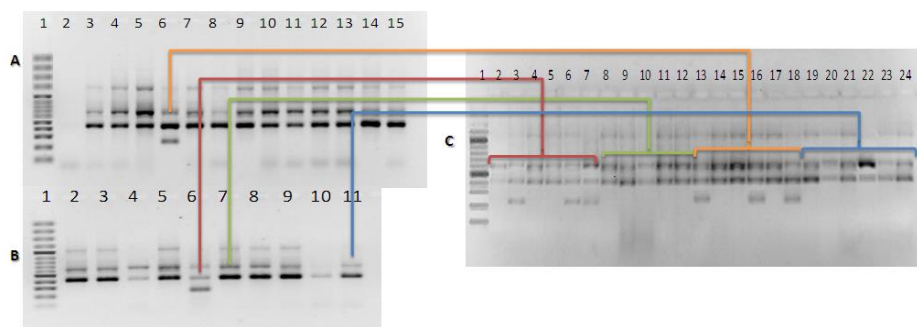


Figura 2-5: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones del gen P23 de CTV de las muestras de lima Tahití colectadas en el huerto ubicado en Corpoica La Libertad. Las filas A y B muestran los productos de PCR de “pools” de seis plantas injertadas sobre cada patrón. **Fila A:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas) Carril 2 a 5: Kryder RI a RIV. Carril 6 a 9: Volkameriano RI a RIV. Carril 10 a 13: Sunky x English RI a RIV. Carril 14 a 15: Citrumelo RI a RII. **Fila B:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carril 2 a 3: Citrumelo RIII a RIV. Carril 4 a 7: Cleopatra RI a RIV. Carril 8 a 11: Cariizo RI a RIV. **Fila C:** Productos de PCR de cada planta de un pool de seis plantas. Carril 1: Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Carril 2 a 7: Cleopatra RIII Planta 1 a 6. Carril 8 a 12: Cleopatra RIV Planta 1 a 5. Carril 13 a 18: Volkameriano RI Planta 1 a 6. Carril 19 a 24: Carrizo RIV planta 1 a 6.

En la población del huerto de cítricos de Nataima (Espinal –Tolima – Colombia), todos los grupos de injertos evaluados presentaron infección por CTV y se detectaron únicamente cepas VT y T30. La incidencia de cepas VT fue mayor respecto a la incidencia de cepas T30. El 50% de los grupos de plantas estaban infectadas únicamente con cepas VT y el 50% estaba infectado con mezcla de cepas VT/T30. Se identificaron cuatro grupos de plantas con mezcla de cepas VT y T30, se escogieron los grupos de plantas volkameriano RI y kryder RI para evaluar planta a planta. En esta evaluación de cada planta se encontró que el 66% de las plantas se encontraban infectadas únicamente con cepas VT. El 34% de la plantas presentó infecciones mixtas entre cepas VT/T30. Al evaluar el grupo de muestras mediante PCR del gen p23, se encontró que el 54% amplificaron únicamente bandas de 612pb y 412pb indicando la presencia de cepas VT, el 46 % amplificó una banda adicional de 239 pb que indica la mezcla de cepas suaves y severas en estos grupos de plantas. Se escogieron dos grupos para evaluarlos planta a planta (kryder RI y Volkameriano RI), se identificó que el 33% de las plantas tenían infección mixta entre cepas suaves y severas, frente al 67% restante que indicó infección únicamente con aislamientos suaves.

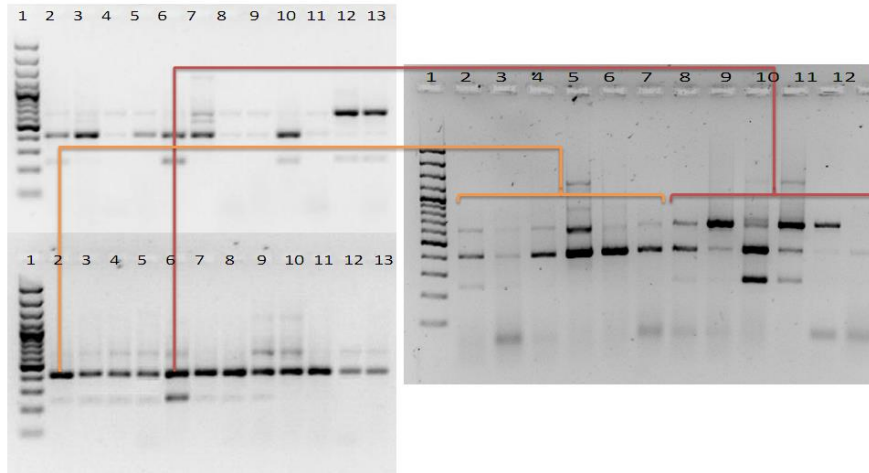


Figura 2-6: Electroforesis en gel de agarosa para visualizar amplicones de CTV (p23) de las muestras de lima tahti colectadas en el huerto ubicado en Corpoica Nataima. Las filas A y B muestran los productos de PCR de “pools” de seis plantas injertadas sobre cada patrón. **Fila A:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carril 2 a 5: Cirumelo RI a RIV. Carril 6 a 9: Sunky x English RI a RIV. Carril 10 a 13: Carrizo RI a RIV. **Fila B:** Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb Fermentas. Carril 2 a 5: Volkameriano RI a RIV. Carril 6 a 9: Kryder RI a RIV. Carril 10 a 13: Cleopatra RI a RIV. **Fila C:** Productos de PCR de cada planta de un pool de seis plantas Carril 1: Marcador de peso molecular 100 pb (Fermentas). Carril 2 a 7: Volkameriano RI plantas 1 a 6. Carril 8 a 13: Kryder RI Plantas 1 a 6.

La secuenciación directa de los productos de PCR de los grupos severo VT y T36 y del grupo suave T30 reveló una alta identidad con los respectivos aislamientos. Presentaron porcentajes de identidad del 99% y porcentajes de cobertura entre el 99 y 100% con los aislamientos registrados en el Genbank (Tabla 2).

Origen	Material	Muestra	Identidad	Accesión	Identidad%	Cobertura%	Gaps
La Libertad	CIEORIVP5	T36_001	T36	E.U937521,1	99	100	0
La Libertad	CLEORIIIP3	T36_002	T36	E.U937521,1	99	99	0
La Libertad	VOLRIP6	T30_003	T30	AF260651,1	99	100	0
La Libertad	CLEORIIIP6	T30_004	T30	AF260651,1	99	100	0
La Libertad	VOLRIP1	VT_005	VT	EU262674,1	99	99	0
La Libertad	CLEORIVP5	VT_006	VT	EU262674,1	99	100	0
Nataima	VOLRIP3	VT_007	VT	AY295898,1	99	100	0
Nataima	VOLRIP4	VT_008	VT	AY295898,1	99	100	0
Nataima	VOLRIP3	T30_009	T30	DO3550701	99	99	0
Nataima	VOLRIP4	T30_010	T30	DO3550701	99	99	0

Tabla 2-2: Resumen de identidad de las secuencias de las muestras con accesiones del GeneBank

2.4 Discusión

Los resultados indican que las plantas de los huertos de lima Tahití de La Libertad tienen infección de un complejo de cepas T30, VT y T36, frente a la población de Nataima cuyo complejo de infección se restringe a cepas T30 y VT. La incidencia de infección por cepas del grupo severo VT fue alta en los huertos evaluados, acorde con lo reportado previamente acerca de su amplia distribución e incidencia en Colombia (Peñaranda *et al.*, 1996; Oliveros *et al.*, 2010; Delgado *et al.*, 2004; Martínez y Guzmán 2007). Se identificaron cepas suaves T30 en las dos poblaciones de lima Tahití, y la proporción de infección fue mayor en Nataima respecto a La Libertad. Esto podría indicar que las cepas de este tipo posiblemente se han dispersado por el país, encontrándose inicialmente en Mompóx (Bolívar) y luego en Cundinamarca (Peñaranda *et al.*, 1996; Oliveros *et al.*, 2010). En el presente trabajo, las cepas T30 fueron detectadas en Villavicencio (Meta) y Espinal (Tolima). Se identificaron cepas T36 en el huerto La Libertad (Villavicencio – Meta) a través de los marcadores específicos del gen de la polimerasa, esta detección corrobora estudios preliminares que sugieren la presencia de este tipo de cepas mediante secuencias del gen CP (Peñaranda *et al.*, 1996). Las secuencias del gen de la polimerasa indican identidades entre el 99 y el 100% de las muestras positivas para las cepas VT, T30 y T36. La detección de las cepas T36 es preliminar y debe ser corroborada con marcadores de otros genes que sean informativos para discriminar este tipo de cepas. Estudios de infección mixta presentes en campo han mostrado que es frecuente encontrar mezcla de cepas VT/T30, y en casos excepcionales T30/T36 (Roy y Bransky, 2004).

Los resultados obtenidos muestran plantas con infecciones mixtas en varias combinaciones: plantas infectadas con cepas VT/T30, VT/T36 y VT/T30/T36. Se encontró alta concordancia entre los primers del gen de la polimerasa y los primers del gen p23 para identificar genotipos de CTV. Muestras que indicaron infección únicamente con VT con los primers del gen de la polimerasa, con p23 indicaron que pertenecían al grupo severo que podrá ser VT ó Barao B.

La notable predominancia en campo de cepas VT respecto a T30 y T36 genera interrogantes de la forma en que se dio la dinámica de infección de CTV. El material fue plantado al mismo tiempo, sin embargo las proporciones de infección son diferentes.

¿Hay alguna adaptación de las diferentes cepas de CTV a los vectores locales? En los campos de cítricos de Colombia es predominante el vector *Toxoptera citricida* y se sabe que este es vector mas eficiente de las cepas de CTV tipo VT, de manera tal que podría haber una relación lógica con la dinámica de infección, ¿Fue efectiva la producción de yemas libres de virus? Realmente no se logro llevar una trazabilidad del material desde la liberación en vivero hasta su establecimiento en campo, no obstante se piensa que probablemente cepas T36 encontradas únicamente en el huerto de La Libertad son procedentes de campo, ya que de proceder del vivero habría mayor probabilidad de encontrarla en Nataima y como se mostro este resultado fue negativo. ¿Por qué se da una delta de incidencia tan alta en tan solo dos años? El vector *Toxoptera citricida* tiene la capacidad de infectar el 95% de una población de cítricos en 2 a 4 años (Gottwald *et al.*, 1996), es predominante en campo y probablemente se una de las causas de dicho comportamiento. No obstante, no tenemos evidencia de la actividad del vector en las parcelas de estudio para explicar este comportamiento, o sí puede tener mayor afinidad por la transmisión de cepas VT.

Con las secuencias obtenidas fue posible confirmar los resultados obtenidos por RT-PCR del gen de la polimerasa. Se encontraron valores de incidencia diferentes entre cepas VT y T30 en las dos áreas geográficas evaluadas. Las plantas de lima Tahití de Nataima presentaron masivamente infecciones mixtas entre cepas suaves T30 y severos VT. Los primers del gen p23 mostraron las muestras con infecciones mixtas VT/T30, lo cual se evidencia por la amplificación de bandas de 612, 412 y 239 simultáneamente(Giampan *et al.*, 2010).

En la Libertad no fue posible identificar plantas con infección exclusiva de cepas del grupo severo T36 mediante RT-PCR bidireccional del gen p23. Esto debido a que la totalidad de los cítricos tenían infección con cepas del grupo VT en mezcla con otras cepas. Por lo tanto, la banda de 612pb que indica la infección con la cepa T36 nunca la encontraríamos sola a menos de que el cítrico presente únicamente infección con estacepa.

2.5 Bibliografía

Albiach-Marti, M R., Mawassi,M., Gowda, S., Satyanarayana, T., M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., López, C.,Guerri, J.,Florez,R., Moreno, P., Garnsey, S., M.,

Dawson, W.O. 2000. Sequences of *Citrus Tristeza Virus* separated in time and space are essentially identical. *J. Virol.* 74, 6856- 6865.

Bar-Joseph, M., Loebenstein, G. and Cohen, J. (1972) Further purification and characterization of threadlike particles associated with the citrus tristeza disease. *Virology*, 50, 821–828.

Bar-Joseph, M., Marcus, R., Lee, R.F. (1989) The continuous challenge of *Citrus Tristeza Virus* control. *Annual Review of Phytopathology* 27, 291-316.

Cerni, S., Ruscic, J., Nolasco., G, Zivko., G, Krjacic., M, skoric, D. 2007. Stem pitting and seedling yellows symptoms of *Citrus Tristeza Virus* infection may be determined by minor sequence variants. *Virus Genes* 36:241-249.

Delgado, J., Guzmán, M., Caicedo, A., Ordúz, J. 2004. CTV screening of Colombian germplasm banks kept in Palmira (Valle del Cauca) and Villavicencio (Meta) and preliminary estimation of CTV variants by RFLP and SSCP 44 Meeting of the American Phytopathological Society Caribbean Division La Habana, mayo 24-28. *Memorias*.

Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F. and Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of *Citrus Tristeza Virus* particles. *Phytopathology*, 86, 1331–1335.

Garnsey, S.M., Gonsalves, D., and Purcifull, D. E. 1978. Rapid diagnosis of citrus Tristeza virus infections by sodium dodecyl sulfate-immunodiffusion procedures. *Phytopathology* 68:88-95.

Garnsey, S. M., D. J. Gumpf, C. N. Roistacher, E. L. Civerolo, R. F. Lee, R. K. Yokomi, and M. Bar-Joseph 1987. Toward a standardized evaluation of the biological properties of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytophylactica* 19: 151-157.

Gonsalves, D., Purcifull, D., Garnsey, S.M. 1978. Purification and serology of *Citrus Tristeza Virus*. *Phytopathology* 68, 553-559.

Hilf, M.E., Karasev, A.V., Pappu, H.R., Gumpf, D.J., Niblett, C.L. and Garnsey, S.M. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology*, 208, 576–582.

Hilf, M. E y Garnsey, S.M. 2000. Characterization and Classification of Citrus Tristeza Virus Isolates by Amplification of Multiple Molecular Markers. Fourteenth IOCV Conference, 2000—*Citrus Tristeza Virus*

Hilf, M.E., Mavrodieva, V. A., and Garnsey, S. M. 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.

- López, C., Ayllón, M. A., Navas-Castillo, J., Guerri, J., Moreno, P., and Flores, R. 1998. Molecular variability of the 5'- and 3'-terminal regions of *Citrus Tristeza Virus* RNA. *Phytopathology* 88:685-691.
- Martínez, S , Guzmán, M 2007 Serological analysis of Colombian *Citrus Tristeza Virus* isolates *Phytopathology* 97: S175
- Mawassi, M., Mietkiewska, E., Gofman, R., Yang, G., and Bar-Joseph, M. 1996. Unusual sequence relationships between two isolates of *Citrus Tristeza Virus*. *J. Gen. Virol.* 77:2359-2364.
- Oliveros, O , Torres, J , Morales, G , Guzmán, M , Acosta, O , Peñaranda J 2001 Two common haplotypes of 106 Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 1 Julio 2009 94-106. The CPm gene(p27) in Colombian field isolates of the *Citrus Tristeza Virus* In: proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus virologists Riverside: IOCV University of California, Abstracts
- Oliveros-Garay, O.A, Martinez-Salazar, N-, Torres-Ruiz, Y., Acosta, O. CPm gene diversity infield isolates of *Citrus Tristeza Virus* from Colombia. *Arch Virol.* 2009;154(12):1933-7
- Peñaranda, J. Acosta, O. Guzman, M. Barney, A. Pappu, H, Pappu, S. Manjunath, L. Febre, J. Niblett, L. 1996. Incidence and characterization of mild and severe isolates of *Citrus Tristeza Virus* from Colombia. Thirteenth IOCV Conference.
- Rodriguez, P., De Perez, G., Guzman, M., 2009. Detección del virus de la tristeza de los cítricos por serología, microscopía e hibridación in situ. *Revista Colombiana De Biotecnología ISSN: 0123-3475 ed: Instituto De Biotecnología* v.11 fasc.1 p.94 – 106.
- Roy, A. and Brlansky, R.H. 2004. Genotype classification and molecular evidence for the presence of mixed infections in Indian *Citrus Tristeza Virus* isolates. *Arch. Virol.* 149 (10), 1911-1929
- Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., and Ambrós, S. 2009. Discrimination between mild and severe *Citrus Tristeza Virus* isolates with a rapid and highly specific real-time reverse transcription-polymerase chain reaction method using TaqMan LNA probes. *Phytopathology* 99:307-315.
- Sambade. A., Lopez, C., Rubio, L., Flores, R., Guerri, J., Moreno, G. 2003. Polymorphism of a specific región in gen p23 of *Citrus Tristeza Virus* allows discrimination between mild and severe isolates. *Arch Virol* 148: 2325 – 2340.
- Satyanayanana, T., Gowda, S., Boyko, V.P., Albiach-Martí, M.R., Mawassi, M., Navas-Castillo, J., Karasev, A.V., Dolja, V., Hilf, M.E., Lewandowsky, D.J., Moreno, P., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. 1999 An engineered closterovirus RNA

replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 96, 7433–7438.

Satyanayanana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Martí, M.R., Ayllón, M.A., Robertson, C., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. 2000 Closterovirus encoded HSP70 homolog and p61 in addition to both coat proteins function in efficient virion assembly. Virology, 278, 253–265.

Tatineni, S., Robertson, C., Garnsey, S., y Dawson, W. 2011. A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17366-71. Epub 2011 Oct 10.

3. Patrones para lima Tahití *C. latifolia* (Tanaka) frente a la severidad de stem pitting ocasionado por *Citrus Tristeza Virus*

Resumen

Citrus Tristeza Virus induce diversos síntomas dependiendo de tipo de aislamiento ó el complejo de infecciones mixtas y de la especie y variedad del hospedero cítrico. En el presente trabajo se evaluó la severidad de “stem pitting” en lima Tahití injertada sobre seis patrones diferentes. En trabajos preliminares se identificaron las cepas de CTV que infectaron en campo el material objeto de evaluación. Se identificaron cepas de VT predominantes que generan “stem pitting” solas y en infecciones mixtas con cepas T30 y T36. La relación entre la severidad de “stem pitting” con la localidad, los diferentes patrones y cepas de CTV se analizaron mediante análisis de correspondencias múltiples, tablas de contingencia y test de independencia chi cuadrado. Se encontró que la severidad de “stem pitting” está asociada con la localidad geográfica y el patrón, pero no con la mezcla de cepas virales. El patrón Kryder injertado con lima Tahití se muestra prometedor frente a infección por CTV para los materiales cultivados en las localidades de La Libertad y Nataima

Abstract

Citrus Tristeza Virus induces different symptoms, which are related with virus genotype or mixed infections and type of host specie and variety. This study evaluated the severity of “stem pitting” in Tahitian lime grafted on six different patterns. In preliminary work identified CTV strains that infected field material evaluated. Isolates classified as genotype VT were the most frequent and they generate stem pitting alone or in mixed infections with isolates with genotypes T30 and T36. The relationship between the severity of stem pitting with the geographical locality, the different rootstocks and CTV genotype were analyzed by multiple correspondence analysis, contingency tables and chi square test of

independence. The severity of stem pitting depends on the location and rootstocks, but not the mixture of viral strains. The rootstock Kryder show promise against CTV for La Libertad and Nataima

3.1 Introducción

La enfermedad tristeza de los cítricos es causada por *Citrus Tristeza Virus* (CTV), es un agente viral limitante para la producción de cítricos a nivel mundial. Las estrategias de manejo dependen de las condiciones específicas de cada región, dado por las cepas predominantes y la incidencia de CTV. En este sentido las medidas de manejo generales son: i). Programas de certificación de yemas libres de virus y cuarentena para evitar la dispersión de cepas ii) Erradicación de plantas infectadas cuando las incidencias son bajas. iii) Uso de patrones tolerantes a cepas de CTV. iv) Esquemas de protección cruzada con aislamientos suaves frente aislamientos severos. (Gottwald *et al.*, 2002; Moreno *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2002). Las estrategias de manejo de infecciones por CTV en la citricultura colombiana son limitadas. La incidencia de CTV en Colombia es muy alta y no está concentrada en una zona específica de manera tal que la erradicación de plantas no es una opción. Las cepas severas de CTV son predominantes en el país (Peñaranda *et al.*, 1996; Oliveros *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 2004; Martínez y Guzmán 2007) y no hay legislación restrictiva para el flujo de material entre zonas. Las plataformas de protección cruzada exitosas en otros países no son homologables a la citricultura del país. En este orden de ideas las estrategias de manejo que están al alcance son la producción yemas libres de virus y uso de patrones tolerantes a CTV con buena adaptación al trópico bajo para el caso específico de lima Tahití.

La lima Tahití (*Citrus latifolia*L.) puede ser originaria del archipiélago Malayo, no tiene semillas y tiene buena adaptación a regiones tropicales (Castle y Gmitter, 1999), sin embargo exhibe alta susceptibilidad a la enfermedad tristeza de los cítricos (Campbell, 1979). Al igual que otros cítricos su entrada en producción es tardía cuando esta injertada sobre patrones como mandarina cleopatra (Orduz *et al.*, 2006). La producción promedio en parcelas experimentales se estima en 15 ton/ha. Sin embargo, a partir del quinto año hay disminución en los rendimientos a causa de problemas fitosanitarios como CTV (Orduz-Rodriguez *et al.*, 2007; Quiroga *et al.*, 2010).

Los cítricos se propagan mediante el uso de injertos para conservar las características de las plantas madre. El éxito de esta forma de propagación depende de la selección del patrón y del injerto (Agrios, 2005). El uso de patrón confiere varias ventajas como precocidad en la producción, mayor vigor y uniformidad de la plantación, cierto control sobre la calidad y cantidad de la cosecha para una misma variedad, adaptación a problemas físico-químicos del suelo y tolerancia o resistencia a plagas y enfermedades (Orduz y Baquero, 2003). En el presente trabajo se emplearon patrones promisorios para la citricultura en general, como son Volkameriano, Kryder, Sunki x English, Cleopatra, Carrizo y Citrumelo (Orduz, 2003; Orduz *et al.*, 2006). Los antecedentes de comportamiento frente a CTV se describen a continuación. El patrón Kryder (*Poncirus trifoliata* L Raf) ha mostrado tolerancia a la mayoría de aislamientos de CTV y *Fortunella crasiflora* Swing tolerancia a aislamientos específicos de CTV (Mestre *et al.*, 1997; Rai, 2006). En los protoplastos de materiales de *Fortunella* hay replicación del virus, lo que indica que el movimiento de CTV es lo que se restringe (Albiach-Martí *et al.*, 2004) y se presenta es tolerancia (Moreira *et al.*, 1949; Yoshida, 1993; Mestreet *et al.*, 1997). El patrón Swingle Citrumelo (*Citrus paradisi* Macf. x *Poncirus trifoliata* (L.) Raf) inicialmente fue reportado como tolerante a CTV (Hutchison., 1974), sin embargo se detectó susceptibilidad de este material frente a los aislamientos severos B3 y B28, y adicionalmente tiene alta afinidad productiva con lima Tahití (Campbell 1991). El patrón Carrizo Citrange (*Citrus sinensis* Osb. x *Poncirus trifoliata* (L.)) ha reportado niveles de tolerancia heredados de *Poncirus trifoliata* (Garnesey *et al.*, 1996) y ha presentado buen comportamiento frente a CTV injertado con naranja valencia (Mendtet *et al.*, 1988). Sunki x english (*Citrus sunki* Hort. ex Tan. x *Poncirus trifoliata* (L.)) podría tener buenos niveles de tolerancia heredados de *Poncirus trifoliata* (L.). El limón Volkameriano (*Citrus Volkameriana* Ten. y Pasq.) también ha presentado buen comportamiento frente a CTV cuando se injerta con naranja valencia, no obstante hay que tener en cuenta que naranja valencia es menos susceptible a CTV y es posible que su comportamiento no sea homologo en lima Tahití. Mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Horth. Ex Tan)) es reconocido por niveles de tolerancia a CTV, sin embargo, no presenta alta afinidad con lima Tahití y la longevidad productiva de las plantas se limita hasta el año ocho (Stenzel y Neves 2004; Figueiredo *et al.* 2007, Quiroga *et al.*, 2010). Cleopatra es uno de los patrones utilizados con más frecuencia en Colombia, es un material de precocidad media en producción, porte alto que dificulta la cosecha y baja longevidad en campo atribuida a CTV (Orduz-Rodriguez y Avella 2008).

Las cepas severas VT son predominantes en campo, generan el sintoma “stem pitting” que hacen referencia a acanaladuras en el tallo. Estas se dan por la interrupción de la actividad meristemática en áreas limitadas del cambium, lo que resulta en un crecimiento radial irregular (Moreno *et al.*, 2008). Los síntomas que generan estas cepas no colapsan el árbol, pero afecta su crecimiento y desarrollo, producción y calidad de los frutos, y las pérdidas ocasionadas por este tipo de cepas alcanzan hasta el 48% en huertos comerciales de cítricos en Sur Africa (Marais *et al.*, 1996). Las limas ácidas son altamente sensibles a las acanaladuras de tallo. Es posible identificar acanaladuras en el tallo principal en plantas maduras y en las ramas del tercio medio (McClellan y Van Der Plank, 1955). Las cepas T30 se consideran suaves y en algunos casos se presentan como asintomáticos. Las cepas del genotipo T36 son severas “quick decline”, que indica decaimiento rápido sobre todos los cítricos injertados sobre naranjo agrio, es decir un colapso de la planta. El objetivo de este trabajo fue evaluar la severidad de “stem pitting” producida por cepas de CTV infectadas naturalmente en campo sobre seis patrones para lima Tahití.

3.2 Materiales y métodos.

Para el desarrollo de este trabajo se establecieron dos parcelas experimentales en campo. La primera en el centro de investigación Corpoica Nataima, en el Espinal Tolima ubicado en las coordenadas 4° 12' 56" N y 72° 56' 3" O, a 430 msnm, con una temperatura media de 28 °C y una humedad relativa del 70%. La segunda en el centro de investigación Corpoica La Libertad a 2 Km de Villavicencio, ubicado en las coordenadas 9° 6' N, 73° 34' O, a 320 msnm, con una temperatura media de 27 °C y humedad relativa entre el 70 y el 90%. La fase de laboratorio del presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología vegetal, de la facultad de agronomía, de la Universidad Nacional de Colombia.

Material vegetal y colecta de muestras

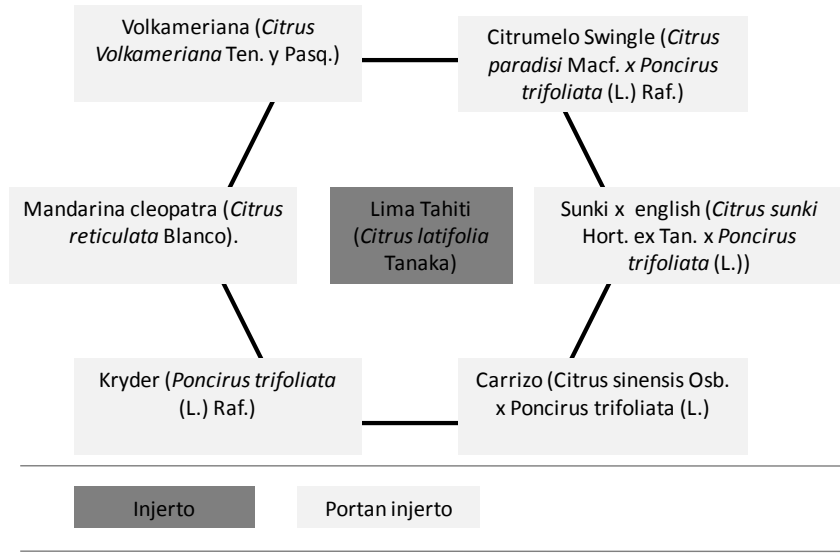


Figura 3-1: Patrones micro injertados con lima Tahití y establecidos en campo

El material vegetal se obtuvo del banco de germoplasma de cítricos ubicado en el centro de investigación Corpoica Palmira. Seis patrones cítricos (Volkameriano, Kryder, Sunki x English, Cleopatra, Carrizo y Citrumelo) fueron micro-injertados con lima Tahití y llevadas a vivero. En campo se establecieron seis plantas por patrón. Las seis plantas se ubicaron en el mismo surco. Cada grupo de seis plantas se estableció de forma aleatoria y se ubicaron cuatro repeticiones

La sintomatología de tristeza se evaluó a través de la intensidad de “stem pitting” presente en las ramas del tercio medio de los cítricos. Se tomaron ramas con corteza verde de 20 cm de largo en cada uno de los ejes cardinales del dosel de cada planta. Las ramas fueron auto clavadas para facilitar el removimiento de la corteza. Se asignó el valor de intensidad de acanaladuras de la siguiente manera: 1 = ausencia de acanaladuras, 2 =escaso o menor número de acanaladuras, 3 = moderado numero de acanaladuras, 4 = muchas acanaladuras superficiales y pocas profundas, 5 = muchas acanaladuras superficiales y profundas. La escala categórica se utilizó de acuerdo a lo establecido por Meissner-Filho *et al.*, (2002). La representación grafica de cada una de las categorías se presenta en la figura 3-2.

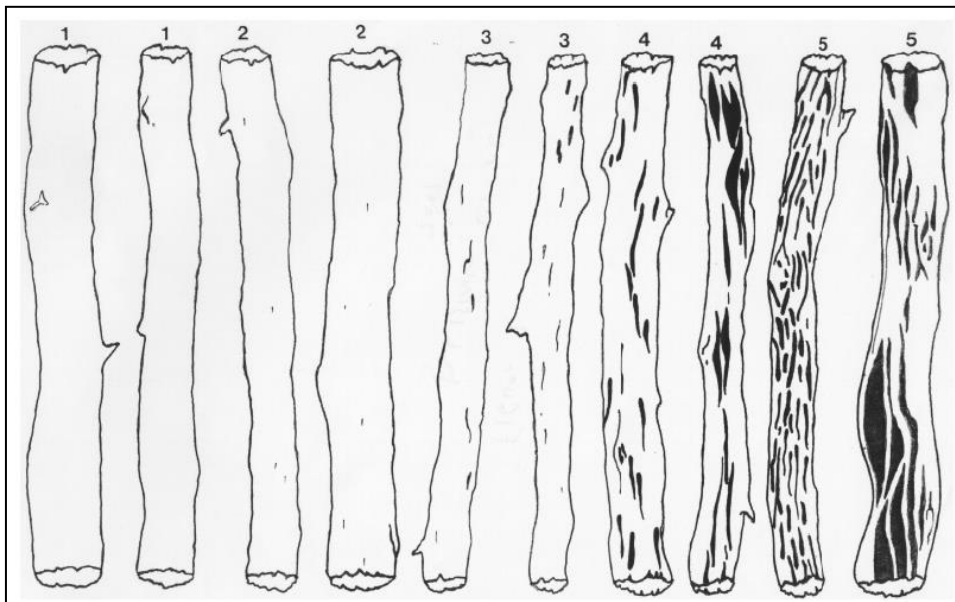


Figura 3-2: Escala diagramática para la evaluar la intensidad de acanaladuras de tallo. Tomada de Meissner-Filho *et al.* (2002).

Asilamientos de CTV

En trabajos preliminares se identificaron cepas de CTV por RT-PCR mediante primers genotipo específico. La disposición de los patrones en campo y la distribución de las de CTV que infectaron se muestran en la figura 3-3. La detección se realizó sobre grupos de plantas injertadas sobre el mismo patrón. En los grupos de plantas en que se detectaron infecciones mixtas se evaluaron planta a planta, lo que indico plantas con infecciones mixtas de cepas VT/T30, VT/T30/T36 y plantas infectadas solo cepas VT. Los resultados de la secuenciación indicaron 99% de identidad de las cepas VT, T30 y T36 con las secuencias del GeneBank reportadas para cada uno de estos genotipos de CTV.



Figura 3-3: Distribución de las cepas de CTV que infectaron de manera natural en campo

Análisis de datos

Se utilizó el programa SAS versión 9.0 para realizar tablas de contingencia y análisis de correspondencias múltiples. La población evaluada se clasificó por localidad, patrón y severidad de "stem pitting". Se analizó si la respuesta de la severidad de stem pitting depende estadísticamente del patrón, la localidad y la cepa de CTV. Se realizó el test de independencia chi – cuadrado (χ^2) con un nivel de significancia de 0,05. Se planteó como hipótesis nula que hay independencia entre las variables de estudio y como hipótesis alterna que no hay independencia entre las variables.

3.3 Resultados

En la evaluación general del material plantado en campo no se identificaron acanaladuras de tallo sobre el tallo principal, esto debido posiblemente a la edad del material. Sin embargo se identificaron acanaladuras en las ramas del tercio medio del dosel de las plantas. Las plantas de los dos huertos evaluados mediante la escala de Meissner-Filho mostraron que la severidad osciló entre los rangos 2 y 4. Por lo tanto, la severidad del material evaluado se estimó como escaso número de acanaladuras -2, moderado número - 3, muchas acanaladuras superficiales y poco profundas- 4. No se identificaron plantas sin acanaladuras en las ramas y tampoco se identificaron ramas con el grado 5 de severidad según la escala de referencia.

Localidad	Patrón	Moderada	Pocas	V_Sup_P_Prof	Total general
La Libertad	Carrizo	12	11	1	24
	Citrumelo	10	13	1	24
	Clepatra	8	16		24
	Kryder	7	16	1	24
	SxE	14	5	5	24
	Volkameriano	14	8	2	24
Total La Libertad		65	69	10	144
Nataima	Carrizo	10	13	1	24
	Citrumelo	5	19		24
	Clepatra	3	21		24
	Kryder	2	22		24
	SxE	3	20	1	24
	Volkameriano		6	17	1

Total Nataima	29	112	3	144
Total general	94	181	13	288

Tabla 3-1 Tabla de frecuencia de la severidad en stem pitting en diferentes patrones y dos localidades diferentes. Pocas= (2) escaso número de acanaladuras, Intermedio= (3) moderado numero de acanaladuras, V_Sup_P_Prof = (4) muchas acanaladuras superficiales y pocas profunda

En la Tabla 3-1 se presentan los valores de severidad “stem pitting” de las plantas en los dos huertos evaluados. La relación entre estas variables se describió y analizó mediante análisis de correspondencias múltiples. La frecuencia de plantas con severidad grado 2 fue de 78% en Nataima frente a 48% de la Libertad. La frecuencia de severidad grado 3 fue de 45% en La Libertad frente a 20% de Nataima. La frecuencia de severidad grado 4 fue de 7% en La Libertad frente a 2% de Nataima. Respecto a la variedad de patrón, se observó que el 21% de las plantas injertadas sobre el patrón Sunky x English de La Libertad presentaron severidad grado 4 frente al 58% que presentaron grado 3 de severidad. Las plantas injertadas sobre el patrón carrizo presentaron frecuencias similares de plantas con severidad en grados 2 y 3 en las dos localidades. Los patrones cleopatra y kryder presentaron las altas frecuencias de severidad grado 2, así: cleopatra tuvo frecuencia de 88% en Nataima y 67% en La Libertad. Kryder tuvo frecuencia de 92% en Nataima y 67% en La Libertad.

En la figura 3-3 se muestra la validación de los datos de la tabla de frecuencias mediante un grafico de correspondencias múltiples: De acuerdo al aporte de inercia, la dimensión 1 está conformada por las variables localidad y patrón, y la dimensión 2 está conformada por la variable severidad. La severidad de stem pitting sobre carrizo y volkameriana fue similar en la Libertad, en el grafico se ubican equidistantes de los puntos de severidad intermedio y menor. Los patrones cleopatra y kryder muestran cercanía con la variable menor severidad. El patrón Volkameriano está más relacionado con grado moderado de severidad en La Libertad y grado menor. En la Tabla 3-1 se presentan los valores de severidad “stem pitting” de las plantas en los dos huertos evaluados. de severidad en Nataima.

La severidad de stem pitting se comporta de manera dependiente del patrón (test de independencia chi cuadrado pvalor= 0.0195<0.05) y se comporta de manera dependiente

de su localización geográfica (test de independencia chi cuadrado $p\text{valor}=0.049 < 0.05$). A partir de estos resultados se evaluó la independencia de la severidad con las cepas que infectaron en campo. Esta se realizó sobre las detecciones realizadas planta a planta.

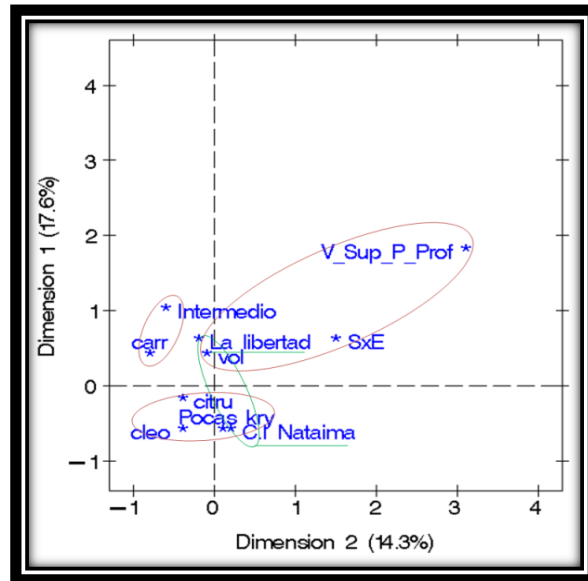


Figura 3-4: Severidad de stem pitting (dimensión 2) vs patrón y localidad (dimensión 1). Menor = (2) escaso número de acanaladuras, Intermedio= (3) moderado número de acanaladuras, V_Sup_P_Prof = (4) muchas acanaladuras superficiales y pocas profundas.

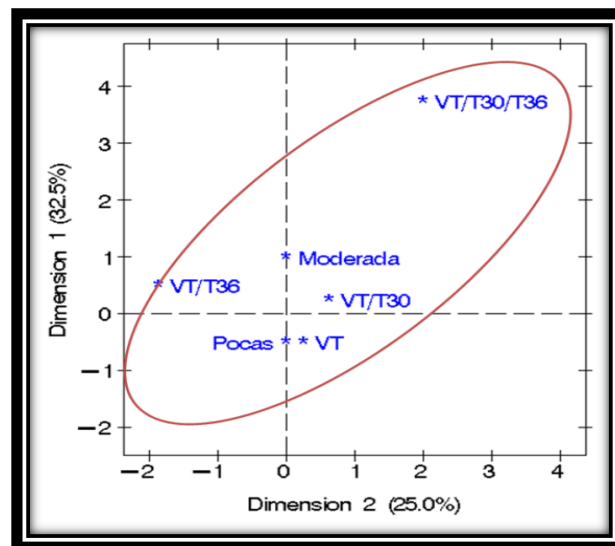


Figura 3-5: Severidad de stem pitting vs asilamientos de CTV. Pocas= (2) escaso número de acanaladuras, Intermedio= (3) moderado número de acanaladuras, V_Sup_P_Prof = (4) muchas acanaladuras superficiales y pocas profundas

La expresión de severidad de stem pitting se comportó de manera independiente del la mezcla de cepas que infectaron (test de independencia chi cuadrado p valor = 0.3672 > 0.05), de manera tal se muestra en gráfico 3-4 que las plantas infectadas con cepas VT, VT/T30 y VT/T36 expresan grados de severidad similares. Una sola planta presentó infección mixta de cepas VT/T30/T36, sin embargo, su expresión de severidad se ubicó dentro de los mismos rangos que plantas infectadas con otras cepas.

3.4 Discusión

La eliminación de la corteza a nivel de ramas jóvenes, permite evaluar estrías o acanaladuras longitudinales a nivel del tejido vascular acorde a sintomatología descrita como síndrome de acanaladura de tallos “stem pitting” (Meissner-Filho *et al.*, 2002; Magri *et al.*, 2011). Se encontró que la severidad de CTV es variable según el patrón y la localización, pero no según el complejo de cepas virales. La cepa viral predominante en campo fue VT para las dos localidades. Las plantas en que se identificaron infecciones con la cepa VT o infecciones mixtas VT/T30, VT/T36 ó VT/T30/T36 no tuvieron un efecto sobre la severidad de CTV de acuerdo a la escala de referencia. En el estado fenológico en el que se evalúan estas plantas, no es posible hacer inferencias para explicar modulación de expresión de síntomas mediante procesos de protección cruzada. Tampoco es posible establecer cuál de los genotipos virales presentes en una infección mixta, es predominante en las plantas a fin de explicar el comportamiento de severidad obtenido. El uso de otras escalas como Ndongo ó Horsfall y Barrat no es aplicable a la edad de las plantas, ni al estado sanitario, pues con cualquiera de estas es muy posible confundir otros síntomas generados por CTV con los síntomas causados por otros disturbios como clorosis en las nervaduras. La escala de Ndongo sería aplicable en estados más avanzados de la enfermedad en la planta y fenológicamente más desarrollada. Acorde con lo anterior la escala propuesta por Meissner-Filho *et al* (2002) permitió tener una alta resolución para medir la severidad de la tristeza de los cítricos en lima Tahití .

El test de chi cuadrado indicó que la severidad de “stem pitting” se comporta de manera dependiente del patrón y de la localidad. La dependencia de la localidad se puede explicar a partir de la diferencia de las condiciones ambientales, aunque no hay un estadístico certero de la relación entre las variables ambiente vs severidad. La

comparación de los valores de severidad entre las dos localidades, muestra que grupos de plantas con un mismo patrón infectadas con cepas virales del mismo genotipo presentan un contraste en la severidad, como lo es el caso del patrón Sunky x English cuya severidad tiende al mayor grado en La Libertad, situación que ocurre de manera general con otros patrones. No obstante no conocemos como ha sido la actividad del vector en campo y como afectan los eventos de re-inoculación (Cambra *et al.*, 2002) sobre la respuesta sintomática de la planta.

La dependencia del patrón se podría explicar por la tolerancia específica de la especie de cada patrón. Se observa que hay consistencia entre las proporciones de las frecuencias de severidad para algunos patrones entre localidades. La severidad del patrón carrizo fue muy similar en las dos localidades, se esperaban grados de severidad bajos teniendo en cuenta que este patrón procede de *Poncirus trifoliata* (Garnesey *et al.*, 1996), sin embargo los valores de severidad fueron muy proporcionales entre los grados 2 y 3 para las dos localidades. El patrón citrumelo que también tiene herencia de *P. trifoliata* presentó valores de severidad similares a carrizo en La Libertad y una severidad grado 2 en Nataima. El patrón kryder presenta un alto grado de consistencia con las referencias de tolerancia (Mestre *et al.*, 1997; Rai, 2006), la severidad grado 2 fue la más frecuente entre las plantas de las dos localidades. El número de plantas con severidad grado 2 de los patrones citrumelo, cleopatra, y carrizo fue mayor que el número de árboles con grado 3 de severidad, de manera consistente en las dos localidades. Sin embargo la frecuencia de severidad grado 2 siempre fue mayor en Nataima, se puede decir que la severidad de estos patrones es intermedia entre kryder y sunky x english. El patrón limón volkamieriano se comportó de manera inversa en las dos localidades, en la Libertad se presentó un mayor número de plantas con severidad grado 3 respecto a las grado 2 y en Nataima se presentó una distribución inversa. El patrón mandarina cleopatra ha sido caracterizado por exhibir baja afinidad con lima Tahití (Stenzel y Neves 2004; Figueiredo *et al.* 2007, Quiroga *et al.*, 2010) y en algunos casos se limita longevidad atribuida a problemas fitosanitarios como CTV (Orduz-Rodríguez y Avella 2008). Hasta el momento cleopatra se ubica en un punto intermedio de severidad de CTV y no se hacen evidentes incompatibilidades.

En La Libertad se identificaron plantas infectadas con cepas T36 en infección mixta con cepas VT y T30. Sin embargo, no se observó variación en la expresión de síntomas asociados a “stem pitting”. Durante el período de realización de este estudio, estos árboles no han desarrollado síntomas de declinación rápida - quick decline -. Varios factores podrían estar modulando esta respuesta como son el título viral, el estado fenológico de las plantas y variables climáticas, lo que quiere decir que en un futuro podrían generar la sintomatología asociada a plantas infectadas con este tipo de cepas y colapsar.

Al momento podemos inferir que hay patrones prometedores en términos de baja severidad frente a CTV, sin embargo el estado fenológico del material plantado no permite determinar un mejor patrón. Es necesario que este material de campo continúe con los procesos infección de cepas de CTV y se haga un seguimiento en el tiempo tanto de la dinámica de infección como de la respuesta de severidad.

3.5 Bibliografía

Agrios, G.N. 2005. Plant Patology. Fifth Edition .Elsevier American Press. Department of Plant Pathology. University of Florida. U.S.A. p.922.

Albiach-Martí, M.R., Grosser, J.W., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. 2004 *Citrus Tristeza Virus* replicates and forms infectious virions in protoplast of resistant citrus relatives. *Mol. Breeding*, 14, 117–128.

Cambra, M.C., Martínez, M., Marroquín, C., Gorris, M.T., Zaragoza, I.S., López, A., Olmos, A., y Hermoso de Mendoza, A. 2002. Epidemiology of *Citrus Tristeza Virus* (CTV) in Citrus Varieties Cultivated Under Plastic Net Covers. Fifteenth IOCV Conference, 2002—Short Communications.

Campbell, C.W., 1979. Tahiti lime production in Florida University of Florida. Florida Cooperative. Service, EVA.

Campbell, C.W. 1991. Production of the lime (*Citrus latifolia*, Tanaka). In Florida. University of Florida. Tropical Region 2:184-192.

Castle, W.S. y Gmitter, F.G. 1999. Rootstock and scion selection. En: Citrus health management. Timmer, L.W. y Duncan, L.W. (eds.). University of Florida, APS Press, pp. 21-35.

Delgado, J , Guzmán, M , Caicedo, A , Ordúz, J 2004 CTV screening of Colombian germplasm banks kept in Palmira (Valle del Cauca) and Villavicencio (Meta) and preliminary estimation of CTV variants by RFLP and SSCP 44 Meeting of the American Phytopathological Society Caribbean Division La Habana, mayo 24-28 Memorias

Garnsey, S.M., Su, H.J. and Tsai, M.C. (1996) Differential susceptibility of pummelo and Swingle citrumelo to isolates of *Citrus Tristeza Virus*. In: Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (da Graça, J.V., Moreno, P. and Yokomi., R.K., eds), pp. 138–146. Riverside, CA: IOCV.

Gottwald, T.R., Polek, M. and Riley, K. (2002) History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus Tristeza Virus* in the California Central Valley. In Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (Duran-Vila, N., Milne, R.G. and da Graça, J.V., eds), pp. 83–94. Riverside, CA: IOCV.

Hutchison, D. J. 1974. Swingle citrumelo-A promising rootstock hybrid. Proc. Fla. State Hort. Soc. 87:89-91.

Figueiredo, .J.O., Stuchi, E.S., Laranjeira, F.F., Donadio, I.C., Sobrinho, J., Sempionato, O.R. y Muller, G.W. 2001. Porta-enxertos para lima ácida 'Tahití ' em duas regiões do Estado de São Paulo. Laranja, v.22, n.1, p.203- 213.

Martínez, S., y Guzmán, M 2007 Serological analysis of Colombian *Citrus Tristeza Virus* isolates Phytopathology 97: S175

McClellan, A.P.D., y Van Der Plank, J.E. 1955. The role of seedling yellows and stem pitting in tristeza of citrus. Phytopathology 45:222-224.

Magri, W., Corazza, M ., Zanutto, C., Carvalho-Nunes, W., Müller, G. 2011. SSCP analysis of *Citrus Tristeza Virus* protectives isolates in Pêra sweet orange clones under northern Paraná state, Brazil conditions. Citrus Research & Technology, Cordeirópolis, v.32, n.1, p.9-16, 2011

Marais, L. J., Marais, M. L., y Rea, M. 1996. Effect of Citrus Tristeza Stem Pitting on Fruit Size and Yield of Marsh Grapefruit in Southern Africa. Thirteenth IOCV Conference, 1996- *Citrus Tristeza Virus*

Meissner-Filho, P.E., Soares-Filho, W., Dos. S., Velame, K.V.C., Diamantino, E.P., y Diamantino, M.S.A.S. 2002. Reação de porta-enxertos híbridos ao *Citrus Tristeza Virus*. Fitopatologia Brasileira 27:312-315. 2002.

Moreira, S, Costa, A.S and Grant, T.J. 1949. Conhecimentos atuais sobre a tristeza dos citrus. Revista de Agricultura 24:335- 345.

Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M.R., Guerri, J., Pena, L., 2008. Citrus tristezavirus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. Mol. Plant Pathol.9, 251–268.

Mestre, P.F., Asins, M.I., Carbonell, E.A and Navarro, L. (1997) New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. to *Citrus Tristeza Virus*. *Theor Appl Genet* 95:691-695.

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., Medina, A. and Zaragoza, S. (2002) The Citrus Variety Improvement program in Spain in the period 1975–2001. In: *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Duran-Vila, N., Milne, R.G. and da Graça, J.V., eds), pp. 306–316. Riverside, CA: IOCV.

Ndongo, B, Ambang Z, Belibi Messanga L, Ngodo Melingui J, B, Ongono Y. Vigour and Behaviour of fifteen citrus varieties against tristeza in the forest zone of Cameroon. Department of Plant Biology Faculty of Sciences, University of Yaoundé I. *Afr. J. Biotechnology*.2007;6(12):1403-1409

Oliveros, O., Torres, J., Morales, G., Guzmán, M., Acosta, O., Peñaranda, J. 2001 Two common haplotypes of 106 Rev. *Colomb. Biotecnol.* Vol. XI No. 1 Julio 2009 94-106. The CPm gene(p27) in Colombian field isolates of the *Citrus Tristeza Virus* In: *proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus irologists* Riverside: IOCV University of California, Abstracts

Orduz, J.O, Baquero, J.E. 2003. Aspectos básicos para el cultivo de los cítricos en el piedemonte llanero. *Revista Achagua* 2003; 7(9):7-19

Orduz, J.O. 2003. Evaluación de patrones en cítricos en suelos ácidos en condiciones de vivero en el Trópico bajo de Colombia. *Revista Achagua*. 2003; 7(9) 24-27.

Orduz, J.O., Arango, I., Monroy, H., Fischer, G. 2006 Comportamiento de la mandarina. Arrayana en seis patrones en suelos ácidos del piedemonte Llanero de Colombia. *Agr. Col.* 2006;24(2):266-273.

Orduz-Rodríguez, J. O., Chacón-Díaz, A., Linares-Briceño, V.M. 2007. Evaluación del potencial de rendimiento de tres especies y un híbrido de cítricos en la región del Ariari del departamento del Meta (Colombia) durante doce años, 1991- 2003. *Revista ORINOQUIA - Universidad de los Llanos - Villavicencio, Meta. Colombia.* Volumen 11 - N° 2.

Orduz-Rodríguez, J., Avella, F. 2008.Comportamiento de 26 cultivares de naranja en condiciones del piedemonte del Meta, Colombia. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas - Vol. 2 - No.2 - pp. 157-172.*

Peñaranda, J., Acosta, O., Guzman-Barney, M., Pappu, H., Pappu, S., Manjunath, L., Febre, J., Niblett, L. 1996. Incidence and characterization of mild and severe isolates of *Citrus Tristeza Virus* from Colombia. Thirteenth IOCV Conference.

Quiroga-Cardona, J., Hernández- Parrado, F.L., Silva- Herrera, M., Orduz-Rodríguez, J.O. 2010. Comportamiento de la producción de lima Tahití (*Citrus latifolia* Tanaka), injertada sobre el patrón de Mandarina Cleopatra (*Citrus reticulata* Blanco) y la influencia del virus de la tristeza (CTV) en condiciones del piedemonte del Meta, 1997-2008. Orinoquia, vol. 14, núm. 1, junio, 2010, pp. 5-15

Rai, M. (2006) Refinement of the *Citrus Tristeza Virus* resistance gene (CTV positional map in *Poncirus trifoliata* and eneration of transgenic grapefruit(*Citrus paradisi*) plant lines with candidate resistance genes in this region. *Plant Mol. Biol.* 61, 399–414.

Stenzel, Neusa. M.C., y Neves. C. (2004) Rootstocks for 'Tahití ' lime. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* [online]. 2004, vol.61, n.2, pp. 151-155. ISSN 0103-9016. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000200005>

Yoshida, T. (1993) Inheritance of immunity to *Citrus Tristeza Virus* of trifoliolate orange in some citrus intergeneric hybrids. *Bull Fruit Tree Res Station* 25:33-43

Conclusiones

En campo se identificaron cepas correspondientes a los genotipos VT, T30 y T36. La cepa VT fue la de mayor incidencia en las dos localidades. La cepa T30 se encontró en las dos localidades, pero con menor incidencia en La Libertad. La cepa T36 se encontró únicamente en la Libertad. Se identificaron plantas con infecciones mixtas VT/T30 y VT/T30/T36. Las secuencias de los productos de PCR corroboraron los resultados obtenidos. Todas las secuencias presentaron 99% de identidad con las secuencias registradas en el GeneBank, sin embargo en trabajos posteriores se sugiere corroborar la presencia de cepas T36 en Colombia mediante otros marcadores moleculares. Se recomienda realizar seguimiento a los síntomas de los árboles en los que se identificó cepas T36 y T30.

El estudio de la relación entre el patrón, las cepas de CTV y la severidad de stem pitting indicó que la severidad de stem pitting depende de la localidad y el patrón, pero no de la mezcla de cepas virales. En estudios posteriores se requiere estudiar los factores que modulan la respuesta sintomática de árboles de lima tahti infectados con diferentes cepas. No obstante esta respuesta podría ser variable en función del tiempo y trayectoria del los árboles en campo. Preliminarmente el patrón Kryder injertado con lima Tahití se muestra prometedor frente a CTV para las localidades de La Libertad y Nataima, de acuerdo a la severidad de stem pitting presentada y al movimiento viral restringido de CTV (Albiach-Martí *et al.*, 2004).