



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

## **RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Citrus sinensis* L. Osbeck Y *C. latifolia* Tanaka INOCULADOS CON AISLADOS ATENUADOS DE *Citrus tristeza virus***

ROSALBA CONTRERAS MAYA

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2022



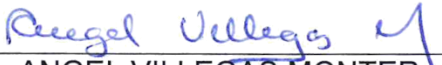

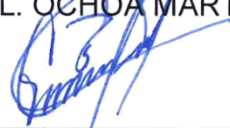
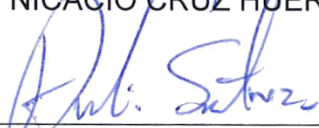

# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Respuesta fisiológica de *Citrus sinensis* L. Osbeck y *C. latifolia* Tanaka inoculados con aislados atenuados de *Citrus tristeza virus***, realizada por el (la) estudiante: **Rosalba Contreras Maya**, con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

## CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO (A)	 DR. ANGEL VILLEGAS MONTER
ASESOR (A)	 DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ
ASESOR (A)	 DR. NICACIO CRUZ HUERTA
ASESOR (A)	 DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA
ASESOR (A)	 DRA. LAURA D. ORTEGA ARENAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, septiembre de 2022

# RESPUESTA FISIOLÓGICA DE *Citrus sinensis* L. Osbeck y *C. latifolia* Tanaka

## INOCULADOS CON AISLADOS ATENUADOS DE *Citrus tristeza virus*

Rosalba Contreras Maya, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2022

### RESUMEN

*Citrus tristeza virus* (CTV) es una de las principales amenazas para la producción y calidad de los cítricos en todo el mundo. En México, más del 90% de los árboles de cítricos se encuentran injertados sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), el cual es un portainjerto susceptible a CTV cuando está injertado con naranjo (*C. sinensis* [L.] Osbeck), lima persa (*C. latifolia* Tanaka), pomelo (*C. paradisi* Macf.) y mandarino (*C. reticulata* Blanco). En una primera etapa, se estudió la diversidad de variantes de CTV en huertos citrícolas en las principales zonas productoras de Veracruz. El análisis filogenético de las muestras secuenciadas reveló que los aislamientos en estudio tuvieron semejanza con los aislados T30, T3 y VT. El aislado VT es considerado como una variante severa, que causan decaimiento rápido y severo en árboles de naranjo, clorosis en las hojas y frutos pequeños; también se encontraron aislamientos asintomáticos tipo T30 y T3. La presencia de infecciones mixtas de variantes severas y atenuadas fue alta en las áreas estudiadas. Tomando en cuenta la presencia de variantes atenuadas, en una siguiente etapa, se procedió a la obtención de plantas *Citrus sinensis* y *Citrus latifolia* con presencia de dos variantes (T30 + T3) de CTV como candidatos promisorios para la protección cruzada. Posteriormente en una tercera etapa, se evaluó la respuesta fotosintética para determinar su potencial en un programa de protección cruzada. Las plantas inoculadas de naranjo y persa con las variantes atenuadas mostraron síntomas ligeros o fueron asintomáticas, respuesta similar a las plantas de *Citrus aurantifolia* inoculadas como plantas indicadoras; las inoculaciones con CTV no afectaron la fotosíntesis, pero sí la transpiración y conductancia. La densidad y tamaño de estomas fue diferente entre especies, pero no entre tratamientos. Estos resultados proporcionan elementos sólidos para considerar a la protección cruzada como una alternativa de protección de cítricos ante la inminente amenaza de variantes severas de CTV.

**Palabras clave:** *Citrus tristeza virus*, estomas, fotosíntesis, protección cruzada

**PHYSIOLOGICAL RESPONSE OF *Citrus sinensis* L. Osbeck and *C. latifolia*  
Tanaka INOCULATED WITH ATTENUATED ISOLATES OF *Citrus tristeza virus***

**Rosalba Contreras Maya, Dra.  
Colegio de Postgraduados, 2022**

**ABSTRACT**

*Citrus tristeza virus* (CTV) is one of the main threats to citrus production and quality worldwide. In Mexico, more than 90% of citrus trees are grafted onto sour orange (*Citrus aurantium* L.), which is a CTV-susceptible rootstock when grafted with orange (*C. sinensis* [L.] Osbeck), lime Persian (*C. latifolia* Tanaka), grapefruit (*C. paradisi* Macf.) and mandarin (*C. reticulata* Blanco). In the first stage, the diversity of CTV variants in citrus orchards in the main producing areas of Veracruz was studied. Phylogenetic analysis of the sequenced samples revealed that the isolates under study were similar to isolates T30, T3, and VT. The VT isolate is considered a severe variant, which causes rapid and severe decay in orange trees, chlorosis in the leaves, and small fruits; asymptomatic isolates type T30 and T3 were also found. The presence of mixed infections of severe and attenuated variants was high in the studied areas. Taking into account the presence of attenuated variants, in the next stage, we proceeded to obtain *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* plants with the presence of two variants (T30 + T3) of CTV as promising candidates for cross-protection. Subsequently, in a third stage, the photosynthetic response was evaluated to determine its potential in a cross-protection program. The orange and Persian plants inoculated with the attenuated variants showed mild symptoms or were asymptomatic, a similar response to the *Citrus aurantifolia* plants inoculated as indicator plants; inoculations with CTV did not affect photosynthesis but did affect transpiration and conductance. The density and size of stomata were different between species, but not between treatments. These results provide solid elements to consider cross-protection as an alternative for citrus protection against the imminent threat of severe variants of CTV.

**Key words:** *Citrus tristeza virus*, cross protection, photosynthesis, stomata

## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada.*

*Al Colegio de Postgraduados campus Montecillo por mi formación profesional y en especial al Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad – Fisiología Vegetal.*

*De igual manera, quiero agradecer a mi consejero Dr. Angel Villegas Monter por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas.*

*Asimismo, agradezco a mis asesores: Dra. Laura Ortega Arenas, Dr. Nicacio Cruz Huerta, Dr. Daniel Ochoa Martínez y Dr. Amalio Santacruz Varela, a mis compañeros de estudio, profesores y personal de laboratorio quienes fueron los que me acompañaron en cada paso que di.*

*Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todos aquellos que se involucraron en mi trabajo de investigación, al Vivero Cazonas, a los productores de cítricos de Veracruz que me permitieron el acceso a sus instalaciones y huertos para llevar a cabo mi trabajo de investigación.*

## DEDICATORIA

*El esfuerzo realizado en mis estudios doctorales para obtener un buen trabajo de investigación es dedicado principalmente a mis padres Isabel Maya Sánchez y Juan Contreras Padilla, mis hermanas Lety, Mine, Mago, mis sobrinos Jasy, Benja, Cris y a mi novio Hector, por el apoyo y por ser los que siempre estuvieron conmigo. Son mi principal fuente de motivación para seguir adelante, levantarme una y otra vez.*

*Un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales. Gracias a la familia Maya y a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.*

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIA .....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
Clasificación y morfología de <i>Citrus tristeza virus</i> .....	3
Variantes de <i>Citrus tristeza virus</i> .....	4
Cambios fisiológicos causados por virus .....	5
Transmisión de <i>Citrus tristeza virus</i> .....	5
Síntomas ocasionados por <i>Citrus tristeza virus</i> .....	5
Estrategias de manejo CTV-Áfidos.....	6
Mecanismos de defensa en plantas a patógenos .....	7
Cambios fisiológicos causados por virus .....	8
CHAPTER I. PREVALENCE OF MILD T30, T3, AND SEVERE VT STRAINS OF <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> IN CENTRAL-NORTHERN VERACRUZ, MEXICO .....	10
1.1 ABSTRACT .....	10
1.3 MATERIALS AND METHODS.....	12
1.3.1 Sampling area .....	12
1.3.2 RNA Extraction.....	13

1.3.3 Amplification of CP Genomic Region by RT-PCR.....	14
1.3.4 Sequencing and phylogenetic analysis .....	15
<b>1.4 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Citrus tristeza virus detection .....	16
1.4.2 <i>Citrus tristeza virus</i> strain detection.....	18
1.4.3 <i>Citrus tristeza virus</i> strain phylogeny.....	21
<b>1.5 CONCLUSION.....</b>	<b>23</b>
<b>1.6 ACKNOWLEDGMENTS .....</b>	<b>24</b>
<b>1.7 CONFLICTS OF INTEREST .....</b>	<b>24</b>
<b>CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> EN VERACRUZ Y SU POTENCIAL EN LA PROTECCIÓN CRUZADA .....</b>	<b>25</b>
2.1 RESUMEN .....	25
2.2 INTRODUCCIÓN .....	26
2.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	28
2.3.1 Muestreo y propagación de plantas.....	28
2.3.2 Extracción de ácidos nucleicos.....	29
2.3.3 Uso de plantas indicadoras .....	30
<b>2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
2.4.1 Detección de patógenos .....	31
2.4.2 Agrupación de plantas de interés .....	32
2.4.3. Prueba biológica.....	33
2.4.4 Exclusión de superinfección .....	34
<b>2.5 CONCLUSIÓN.....</b>	<b>35</b>



2.6 AGRADECIMIENTOS.....	35
2.7 CONFLICTO DE INTERESES .....	35
<b>CAPÍTULO III. RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE <i>CITRUS SINENSIS</i> Y <i>CITRUS LATIFOLIA</i> INOCULADOS CON <i>CITRUS TRISTEZA VIRUS</i> VARIANTES T30 Y T3 .....</b>	
<b>T3 .....</b>	<b>36</b>
3.1 RESUMEN .....	36
3.2 INTRODUCCIÓN .....	37
3.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
3.3.1 Plantas empleadas.....	40
3.3.2 Extracción de RNA y RT-PCR .....	41
3.3.3 Secuenciación y análisis filogenético.....	41
3.3.4 Variables fisiológicas evaluadas .....	42
3.3.5 Tamaño y densidad de estomas.....	43
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	44
3.4.1 Síntomas de plantas inoculadas .....	44
3.4.2 Análisis filogenético .....	46
3.4.3 Fotosíntesis en plantas inoculadas .....	48
3.4.4 Transpiración y conductancia estomática .....	50
3.4.5 Densidad estomática en plantas inoculadas.....	52
3.4.6 Dimensión de estomas .....	56
3.5 CONCLUSIÓN .....	58
3.6 AGRADECIMIENTOS.....	58
3.7 CONFLICTO DE INTERESES .....	59

<b>DISCUSIÓN GENERAL.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>65</b>

## LISTA DE CUADROS

<b>Table 1.1 Genotype-specific primer sequences were used for reverse-transcription polymerase chain reaction to amplify <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV) strains. ....</b>	<b>14</b>
<b>Cuadro 2.1. Detección de patógenos asociados a cítricos en dos municipios de Veracruz durante la colecta de varetas .....</b>	<b>32</b>
<b>Cuadro 2.2. Plantas positivas a variantes de CTV injertadas con varetas de tres procedencias.....</b>	<b>33</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de la organización genómica de <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV). .....	4
Figure 1.1 Incidence (%) of <i>Citrus tristeza virus</i> in eight municipalities in Central and Northern Veracruz, Mexico. ....	16
Figure 1.2. Percentage of positive samples for <i>Citrus tristeza virus</i> by species. .....	18
Figure 1.3. Incidence of <i>Citrus tristeza virus</i> strains in eight municipalities of Veracruz, Mexico. ....	19
Figure 1.4. Simplex reverse-transcription polymerase chain reaction (RT- PCR).....	20
Figure 1.5. Phylogenetic reconstruction of the <i>Citrus tristeza virus</i> .....	22
Figura 2.1. Síntomas en hojas de <i>Citrus aurantifolia</i> inoculados con CTV.....	34
Figura 3.1. Hojas de lima ácida mexicana cinco meses después de la inoculación. ....	45
Figura 3.2. Gel de agarosa 2% de productos de RT-PCR de plantas de cítricos inoculadas con T30 + T3.....	46
Figura 3.3. Reconstrucción filogenética de <i>Citrus tristeza virus</i> (T30 + T3) máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (JC). .....	47
Figura 3.4. Valores medios de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática en tres especies de cítricos ( <i>C. sinensis</i> [L.] Osbeck, <i>C.</i> <i>latifolia</i> Tanaka y <i>C. aurantifolia</i> Swingle) inoculadas con las variantes T30 + T3 de CTV.....	49

<b>Figura 3.5. Conductancia estomática y transpiración en tres especies de cítricos inoculadas y no inoculadas con CTV (T30 + T3).....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 3.6. Estomas de hojas de cítricos.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 3.7. Densidad estomática en <i>C. sinensis</i> [L.] Osbeck, <i>C. latifolia</i> Tanaka y <i>C. aurantifolia</i> Swingle inoculados con CTV (T30 + T3) de tres procedencias. ....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 3.8. Densidad estomática medida en naranjo Campbell, lima Persa y lima ácida mexicana.....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 3.9. Tamaño medio (largo y ancho <math>\mu\text{m}</math>) de estomas en tres especies de cítricos.....</b>	<b>57</b>

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La tristeza de los cítricos, causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV) es considerada una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos a nivel mundial. Entre 1930 y 1950 en Argentina, Brasil, Uruguay, Colombia y Perú causó la muerte de 20 millones de árboles, injertados sobre naranjo agrio (*C. aurantium* L.), especie susceptible al CTV cuando es utilizada como portainjerto de naranjo (*C. sinensis* [L.] Osbeck), lima persa (*C. latifolia* Tanaka), pomelo (*C. paradisi* Macf.) y mandarino (*C. reticulata* Blanco); [1 y 2]. Entre 1952 y 1980, ocurrieron epidemias similares en Venezuela y Jamaica [3 y 4], Florida, USA [5 y 6] y España [7] causando a la fecha daños considerables.

Existen tres intensidades de síntomas asociados con CTV: 1) severos o graves: causados por aislamientos de este patógeno que inducen decaimiento rápido y muerte en árboles de cítricos injertados en naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y limón (*C. limon* L.); 2) moderados: que provocan picado del tallo en pomelos (*C. paradisi* Macf.) y naranjos dulces (*C. sinensis* [L.] Osbeck); y 3) leves o atenuados: que producen amarillamiento o decoloración de brotes en naranjas agrias, limones y pomelos, que se producen en invernadero [8].

El análisis de secuencias utilizando genomas completos de varios aislados de CTV de todo el mundo permitió reconocer seis variantes: T36, VT, T30, T3, RB, T68 y una entidad recombinante denominada HA16-5 [9 y 10]; las variantes VT y T36 han sido descritas biológicamente como severas y T30 como leve o atenuada, cada aislado puede inducir síntomas diferentes, o incluso asintomático [11 y 12].

En México, las primeras detecciones de CTV se realizaron en Tamaulipas (1983) y Veracruz (1986). Después en Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Morelos, Michoacán (2000), así como en Colima y Nuevo León (2005) [13; 14 y 15]. Hasta 2007, la Dirección General de Sanidad Vegetal detectó y eliminó plantas infectadas. Sin embargo, esta enfermedad dejó de regularse [16, 17 y 18], situación que provocó que la enfermedad y sus vectores continuaran expandiéndose en las plantaciones de cítricos. Esto es preocupante debido a que en la citricultura mexicana predomina el portainjerto naranjo agrio (*C. aurantium* L.) que lo hace aún más vulnerable al CTV [19].

En México, hasta la fecha no se tienen reportes de que el CTV haya causado epidemias severas como las registradas en otros países, aun cuando en huertos de *C. sinensis* y *C. aurantifolia* en Baja California, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz existen reportes de variantes severas [16; 20 y 21], también, se tiene registro de la presencia de los principales áfidos vectores de CTV [15; 17 y 22].

De acuerdo con Müller y Costa [23], en Brasil, Sudáfrica, Australia y Japón, la protección cruzada es la mejor opción para controlar CTV [2]. La protección cruzada, también conocida como "preinmunización", es un método de control de virus en plantas, mediante el cual una planta se infecta deliberadamente con un aislado leve de un virus para protegerla contra el daño causado por un aislado severo del mismo virus [24]. En México, la incidencia de plantas con síntomas severos asociados a CTV consistentes en: amarillamiento de brotes, muerte de ramas terminales, frutos pequeños e incluso muerte repentina de árboles ha aumentado, lo que sugiere que el patógeno está cobrando

importancia como factor restrictivo para la citricultura mexicana, altamente vulnerable por utilizar el naranjo agrio como portainjerto.

Estudios recientes de Contreras-Maya y Villegas-Monter [25] señalan la existencia de variantes severas de CTV tipo VT en los principales municipios productores de cítricos de Veracruz, de darse las condiciones adecuadas este patógeno podría ocasionar una epidemia con graves consecuencias económicas; razón por la cual es necesario plantear una alternativa sostenible y eficiente para la producción cítrica en México. Con base en lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron determinar la presencia y distribución de aislamientos de CTV en regiones cítricas del centro y norte de Veracruz, así como la evaluación y selección en condiciones controladas, de aislamientos promisorios para la protección cruzada.

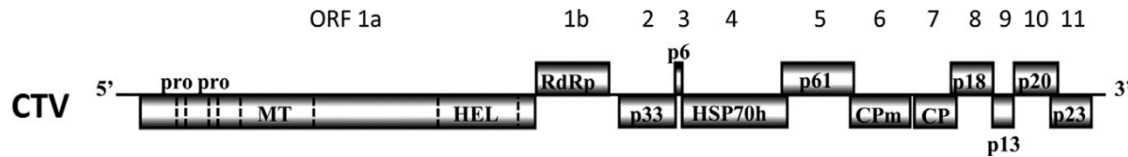
## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Clasificación y morfología de *Citrus tristeza virus***

Taxonómicamente *Citrus tristeza virus* (CTV) se ubica en el género Closterovirus y familia Closteroviridae [26]. Los viriones tienen forma de varilla largas y flexibles de 12 x 2000 nm; constituido de RNA genómico-monocatenario de ~ 19.3 kb, con dos proteínas de la cápside [27] y organizado en 12 marcos de lectura abierta (ORFs- Open Reading Frames) (**Figura 1**). Los ORF 1a y 1b codifican las proteínas para la replicación del virus. Los ORFs 6 y 7 codifican las proteínas de cubierta mayor y menor (CP y CPm, respectivamente), p61 relacionadas al ensamblaje de viriones [28 y 29]; p6 asociada con



el movimiento del virus; p20 y p23 son supresores del silenciamiento del RNA junto con la CP; p33, p18 y p13 son importantes en la infección del virus [30; 31 y 32].



**Figura 1.** Diagrama de la organización genómica de Citrus tristeza virus (CTV). ORFs 1a-11. PRO: dominio de la proteasa; MT: metiltransferasa; HEL: helicasa; RdRp: RNA polimerasa RNA dependiente; HSP70h: homólogo de la proteína de choque térmico 70; CPm: cubierta proteica menor; CP: cubierta proteica mayor [29].

El genoma del CTV está conformado por secuencias homólogas que varían entre sí hasta 4 %. Dentro de la población del CTV existen variantes, genotipos o aislados [33]. Cada variante puede inducir síntomas diferentes [16 y 34], o incluso ser asintomática [17]. El daño severo se presenta en árboles de naranjo (*C. sinensis* [L.] Osbeck), pomelo (*C. paradisi* Macf.) y mandarino (*C. reticulata* Blanco) injertados en naranjo agrio (*C. aurantium* L.), así como en árboles de lima ácida mexicana (*C. aurantifolia* Swingle) independientemente del portainjerto utilizado [35].

### **Variantes de *Citrus tristeza virus***

Con base en múltiples marcadores moleculares y análisis filogenéticos, se tienen identificados seis variantes: T36, T30, VT, RB, T68/B165 y T3/NZ-M16 [9; 10; 11; 36; 37 y 38], con diferencias entre estas menores al 5% [8; 36 y 37] y en campo la mayoría de los cítricos infectados por CTV suelen presentar más de una variante [39; 40 y 41].

## **Cambios fisiológicos causados por virus**

Durante la infección del virus en la planta, se llevan a cabo diversos eventos; en la célula inicialmente infectada ocurre la replicación y ensamblaje intracelular de las proteínas y RNA virales; el movimiento célula a célula es mediado por una o más proteínas de movimiento a través de plasmodesmos; por último, la multiplicación de virus en las partes distantes de la planta [42; 43 y 44].

## **Transmisión de *Citrus tristeza virus***

El virus es transmitido por áfidos de manera semipersistente, dentro de los cuales los cuatro vectores principales son *Aphis gossypii* (Glover), *A. spiraecola* (Patch), *Toxoptera aurantii* (B de F) y *T. citricida* (Kirkaldy) [8 y 45]. La eficiencia de la transmisión depende de la especie del pulgón transmisor, la variante del virus, el portainjerto y la variedad, además de las condiciones ambientales. *T. citricida* se reporta como el vector más eficiente y está presente en el sur y centro de América, desde la cuenca del Caribe, el sureste de México (de Veracruz a Yucatán), Hawai y Florida [46]. *A. gossypii* también se ha considerado como vector eficiente de CTV [47].

## **Síntomas ocasionados por *Citrus tristeza virus***

Los síntomas que causa CTV difieren entre variedades. Los síntomas típicos de esta enfermedad se asocian a menor vigor de los árboles, crecimiento deficiente y desarrollo de frutos pequeños [8]. En árboles cuyo portainjerto es naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), ocurre decaimiento repentino que conduce a su muerte. Otro síntoma es el picado o acanaladura del tallo en naranjo (*C. sinensis* [L.] Osbeck), lima persa (*C. latifolia* Tanaka)

y pomelo (*C. paradisi* Macf.) independientemente del portainjerto utilizado, que conlleva a la reducción del tamaño y calidad del fruto, así como a la reducción del vigor del árbol. El tercer síntoma es el amarillamiento de las hojas en limón y pomelo que ocasiona el retraso del crecimiento [8; 31 y 41].

Para evaluar la severidad de variantes de CTV se realizan bioensayos en plantas indicadoras de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Swingle), pomelo 'Duncan' (*C. paradisi* Macf.) y naranja dulce 'Madame vinous' (*C. sinensis* [L.] Osbeck) injertando parches de corteza [48]. En estas plantas se pueden observar los síntomas clásicos cuando se trata de variantes severas.

### **Estrategias de manejo CTV-Áfidos**

El manejo de las enfermedades virales en distintos cultivos se basa en la prevención así como en la aplicación de medidas en los puntos vulnerables del ciclo del patógeno, para ello es preciso el diagnóstico y el entendimiento del ciclo de la enfermedad, incluyendo los factores abióticos que pueden influir y las labores culturales que se realizan.

Una de las medidas de control más prometedoras es la protección cruzada, que consiste en la inoculación previa de plantas con una variante no severa del virus, que inducirá síntomas ligeros o asintomáticos y que brindará protección contra la infección de variantes severas en campo [49].

La protección cruzada fue aplicada por primera vez por McKinney en 1929 con *Tobacco mosaic virus*, donde las plantas de tomate muestran ligeros mosaicos en comparación con las testigos positivas [50] y a partir de entonces, se ha utilizado como una estrategia

para el manejo de enfermedades causadas por *Citrus tristeza virus* [51 y 52], *Cucumber green mottle mosaic virus* [53], *Soybean mosaic virus* [54], *Cucumber mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus* [55], *Tomato mosaic virus* [56 y 57], East African Cassava mosaic virus-Uganda [58], *Papaya ringspot virus* [59], *Pepper mild mottle virus* [60], *Zucchini yellow mosaic virus* [61 y 62], *Bean yellow mosaic virus*, *Clover yellow vein virus* [63] y *Pepipo mosaic virus* [64].

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en el caso del CTV a gran escala en plantaciones comerciales de cítricos, especialmente con naranjo Pêra en Brasil, donde se han protegido más de 80 millones de árboles. También se ha utilizado en Australia para la protección del pomelo Marsh contra variantes severas, así como para la protección del pomelo Star Ruby en Sudáfrica, naranjo Navel y lima en Perú, pomelo en Argentina y *C. hassaku* en Japón, gracias a lo cual ha continuado la producción comercial de esas variedades de cítricos a pesar de la presencia de variantes severas del CTV en esas regiones [65 y 66].

### **Mecanismos de defensa en plantas a patógenos**

Se ha observado que en las plantas de naranjo agrio inoculadas con CTV no se reduce el floema ni ocurre necrosis de los tubos cribosos, mientras que cuando se utiliza como portainjerto y se infecta con CTV, existe necrosis evidente lo que afecta el suministro de carbohidratos hacia las raíces causando la muerte de las raicillas y al final se observa decaimiento del árbol por el suministro deficiente de agua y nutrientes. Dichos acontecimientos no ocurren en portainjertos tolerantes, trabajos previos han demostrado

que el mecanismo de defensa del naranjo agrio es la muerte celular o reacción de hipersensibilidad (RH) en la zona de infección [67; 68]. En la HR intervienen las especies reactivas de oxígeno (ROS), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) e incremento de óxido nítrico (NO) [69], la síntesis de enzimas como: catalasas y peroxidasas, así como compuestos como fenoles, fitoalexinas y ligninas que protegen las paredes celulares [70].

### **Cambios fisiológicos causados por virus**

Los patógenos pueden causar modificaciones sustanciales en la fisiología del hospedante, lo que puede ocurrir directamente a través de la secreción de enzimas líticas y toxinas o indirectamente a través de las respuestas del hospedante inducidas por el patógeno. Entre los procesos fisiológicos relevantes, la fotosíntesis es la más afectada por patógenos foliares [66; 67 y 68].

El transporte de  $CO_2$  y vapor de agua, impulsado por la fotosíntesis, respiración y transpiración, es fundamental en las hojas y están involucrados en el suministro de energía y compuestos necesarios para varios procesos metabólicos. La infección por virus a menudo disminuye la actividad fotosintética e incrementa la apertura de los estomas [69; 70 y 71]. La síntesis y acumulación excesiva de una proteína viral en las células vegetales también pueden alterar la composición de las proteínas endógenas y ocasionar la reducción significativa de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) [72 y 73], que es la enzima clave para la asimilación fotosintética del  $CO_2$ ; sin embargo, hasta donde se sabe, no se ha realizado ningún estudio para examinar los efectos de la infección viral en el intercambio de gases de las hojas.

Los estomas también permiten que ciertos hongos, bacterias y nematodos entren a la planta. En los últimos años, se ha reconocido que los estomas forman parte del sistema de defensa innato de la planta [74 y 75]; a diferencia de los hongos y bacterias, se desconoce si la infección viral en hospedantes susceptibles reduce la densidad estomática, índice estomático, ocasiona menor pérdida de agua por transpiración y disminuye la apertura o desarrollo de los estomas [76].

# CHAPTER I. PREVALENCE OF MILD T30, T3, AND SEVERE VT STRAINS OF *CITRUS TRISTEZA VIRUS* IN CENTRAL-NORTHERN VERACRUZ, MEXICO<sup>1</sup>

## 1.1 ABSTRACT

The presence and distribution of *Citrus tristeza virus* (CTV) strains on plants of four citrus species required analysis of plants showing small fruits, yellowing, and twig dieback. Typical citrus tristeza symptoms showed in citrus plantations in Veracruz, Mexico, and caused gradual deterioration, low yield, and death of the plants. Seven citrus-growing municipalities in Central and Northern Veracruz presented the severe VT strain: the incidence in seven of the eight sampled municipalities ranged from 7% in Alamo to 50% in Tihuatlan. As for the T30 strain, its presence and distribution ranged from 17% in Tihuatlan to 83% in Cuitlahuac. Values for the T3 strain went from 20% in Castillo de Teayo to 50% in Papantla. In Tihuatlan, two samples were positive for the T36 strain. Only *Citrus sinensis* has historical recording infections by severe strains of CTV, unlike other important citrus species. The incidence of orchards quickly declining increases rapidly in Veracruz, the largest citrus producer in Mexico. It becomes critical as the predominant and sensitive rootstock is sour orange (*Citrus aurantium* L.). It is important to note that the specific primers used could not be identified in 29% of the samples, suggesting that they could be other than T30, T3, VT, and T36 strains.

**Keywords:** Citrus, Incidence, Strains, Quick decline, Severity

---

<sup>1</sup>Publicado como artículo científico en: American Journal of Plant Sciences, 2022, 13: 494-505. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.134032>

## 1.2 INTRODUCTION

The Mexican citrus industry has various phytosanitary challenges like *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus leprosis virus* (CiLV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus viroid II* (CVd-II), *Candidatus liberibacter asiaticus* (CLas), *Xanthomonas axonopodis citri*, and *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* [82] and other unknown alterations such as blight and wood pocket. They all affect production, and it is difficult to define the most important disease in Mexico. Nonetheless, as CTV has caused damage to citrus in various countries since 1900, to this date, it continues to be the most devastating viral disease.

*Citrus tristeza virus* belongs to the genus *Closterovirus*, family *Closteroviridae*, with filamentous particles 2000 nm long x 11 nm in diameter. The genome consists of a 19.3 kb positive-sense RNA molecule with 12 open reading frames (ORFs) encoding up to 19 proteins [9, 83, and, 84]. *Aphis gossypii* (Glover), *Aphis spiraecola*, *Toxoptera aurantii*, and *Toxoptera citricida* are four aphid species that can transmit CTV. The virus transmits readily by grafting and the aphid species mentioned above in a semi-persistent manner [85, 86]. Mexico's main citrus growing areas contain *A. gossypii* (Glover), *A. spiraecola*, *Aphis fabae*, and *T. aurantii* [87].

CTV has been a recurrent citrus disease worldwide. Between 1930 and 1950 in Argentina, Brazil, Uruguay, Colombia, and Peru, CTV killed 20 million trees grafted onto sour orange (*Citrus aurantium* L.), a CTV susceptible species when grafted. A similar epidemic occurred in Venezuela and Jamaica in 1980 [2]. Since 1952, CTV emerged in Florida, USA [6], which has caused considerable damage [16].



In Mexico, *Citrus sinensis* trees showed CTV for the first time in Tamaulipas in 1983. Later, from 1986 to 1993 orchards and nurseries in different municipalities of Veracruz detected positive plants, while it spread to Yucatán, Quintana Roo, Campeche, Morelos, Michoacán by 2000, and to Colima, and Nuevo León by 2005 [12, 16, and, 88].

The three main symptoms associated with this pathogen are: i) quick decline of sweet orange on sour orange (*C. aurantium* L.); ii) stem pitting in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and oranges (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck); iii) seedling yellows on sour orange [8]. Several CTV strains have been identified: VT, T36, T30, T3, RB, and T68 [9 and 45]. T36 and VT have been biologically described as severe strains, while T30 is mild [11 and 88].

In 2017, in Northern Veracruz, orchards of *C. sinensis*, *Citrus latifolia*, *Citrus reticulata*, and *C. paradisi* showed trees with combined symptoms such as defoliation and yellowing, twig dieback, and eventual tree death. This growing problem causes gradual deterioration and low yield, shortening orchards' productive life.

The pathogen is gaining importance as a limiting factor for the Mexican citrus industry due to the extensive use of the highly vulnerable *C. aurantium*. The incidence of plants with symptoms associated with CTV is increasing. This research evaluated the presence and distribution of CTV strain in citrus-producing municipalities in Central-Northern Veracruz, Mexico.

## **1.3 MATERIALS AND METHODS**

### **1.3.1 Sampling area**

The study comprised the main citrus-producing areas of Central-Northern Veracruz in

commercial orchards of *C. sinensis*, *C. latifolia*, *C. reticulata*, and *C. paradisi* of different ages, located in the municipalities of Alamo, Castillo de Teayo, Cazones, Cuitlahuac, Martinez de la Torre, Papantla, Tihuatlan, and Tuxpan. Sampling focused on trees with yellowing symptoms, decline, death of annual branches, and small fruits. From up to two trees, samples included four vegetative shoots in active growth from each orchard (one shoot per cardinal direction).

### **1.3.2 RNA Extraction**

The number of samples per municipality varied: six in Cuitlahuac, nine in Martinez, 10 in Papantla, 15 in Alamo, 18 in Tihuatlan, 18 in Castillo de Teayo, 22 in Cazones, and 22 in Tuxpan. Samples per species divided as seven of *C. paradisi*, 22 of *C. latifolia*, 24 of *C. reticulata* and 67 of *C. sinensis*, as in some sampling areas only one citrus species is grown.

RNA extraction followed this protocol: 0.2 g of the midrib of leaves was macerated in a mortar with liquid nitrogen until obtaining a fine powder; the powder was transferred into a 2 mL microcentrifuge tube with 750  $\mu$ L of EB1 and 75  $\mu$ L of 20% SDS and mixed on a vortex (BenchMixer<sup>TM</sup>). The tubes were incubated at 65 °C for 20 min in a Dry Block Heater (Select BioProducts), mixing them with inversion every 5 min; 250  $\mu$ L of 5M KOAC were added and incubated at 4 °C for 20 min. Subsequently, they were centrifuged at 13,500 rpm at 10 °C for 20 min; 600  $\mu$ L of the supernatant was transferred to a 1.5 mL microcentrifuge tube with 540  $\mu$ L of isopropanol, incubated at -20 °C for 30 min, then centrifuged at 13,500 rpm at 10 °C for 15 min. The supernatant was discarded, and the pellet was allowed to dry. The pellet was then dissolved with 700  $\mu$ L of EB2 at 4 °C for 12

h. The tubes were centrifuged at 13,500 rpm at 4 ° C for 15 min. 600 µL of the supernatant were transferred into a 1.5 mL microcentrifuge tube containing 500 µL of isopropanol and 75 µL of 3M NaOAC. The tube was mixed by inversion five to 10 times and centrifuged at 13,500 rpm at 4 °C for 10 min. The supernatant was discarded, 1 ml of 75% ethanol was added to the formed pellet, and the mixture was centrifuged at 13,500 rpm at 4 °C for 10 min. The supernatant was removed, and the pellet was allowed to dry; once dried, the pellet was resuspended in DNase-free water. Nucleic acid concentration and purity were verified with a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer.

### 1.3.3 Amplification of CP Genomic Region by RT-PCR

**Table 1.1** Genotype-specific primer sequences were used for reverse-transcription polymerase chain reaction to amplify *Citrus tristeza virus* (CTV) strains.

Strains	Polarity	Sequences from 5' to 3'	Product size
CTV	Forward (F)	AAC GCC CTT CGA GTC TGG GGT AGG A	273
	Reverse (R)	TCA ACG TGT GTT GAA TTT CCC AAG C	
T30	Forward (F)	TGT TGC GAA ACT AGT TGA CCC TAC TG	206
	Reverse (R)	TAG TGG GCA GAG TGC CAA AAG AGA T	
T3	Forward (F)	GTT ATC ACG CCT AAA GTT TGG TAC CAC T	409
	Reverse (R)	CAT GAC ATC GAA GAT AGC CGA AGC	
VT	Forward (F)	TTT GAA AAT GGT GAT GAT TTC GCC GTC A	302
	Reverse (R)	GAC ACC GGA ACT GCY TGA ACA GAA T	
T36	Forward (F)	TTC CCT AGG TCG GAT CCC GAG TAT A	836
	Reverse (R)	CAA ACC GGG AAG TGA CAC ACT TGT TA	

Two-step RT-PCR was performed. Synthesis of cDNA was performed using M-MLV reverse transcriptase (PROMEGA) with modification in the reverse transcription reaction (RT), 0.5 µL of each forward and reverse primer (**Table 1**) [12 and 89] were added into a 0.2 mL microcentrifuge tube with 4 µL water and 2 µL of RNA (200 µg µL<sup>-1</sup>) from each sample. The tubes were incubated at 72 °C for 5 min and then placed on ice for 10 min.

Into each microcentrifuge tube, 4  $\mu\text{L}$  of the mix containing 2  $\mu\text{L}$  Buffer 5X of M-MLV (PROMEGA), 1  $\mu\text{L}$  of DTT 0.1M (PROMEGA), 0.5  $\mu\text{L}$  of dNTP's Mix (PROMEGA), and 0.15  $\mu\text{L}$  of M-MLV reverse transcriptase (PROMEGA). Reverse transcription was performed at 42 °C for 60 min, followed by inactivation at 72 °C for 10 min.

PCR was performed in a total reaction volume of 9  $\mu\text{L}$  of the reaction mix. This mix contained 2  $\mu\text{L}$  of Green buffer GoTaq DNA polymerase (PROMEGA), 0.4  $\mu\text{L}$  of  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{L}$  of dNTP's mix, 0.6  $\mu\text{L}$  of each primer F and R [12 and 16], 0.1  $\mu\text{L}$  of GoTaq DNA polymerase (PROMEGA), 5.1  $\mu\text{L}$  of DNase-free water, and 2  $\mu\text{L}$  of cDNA. The PCR conditions proposed by [89] were followed, and the five strains (T36, VT, T3, B165, and T30) were those proposed by Roy [12]. The products were visualized on a 2% agarose gel with ethidium bromide.

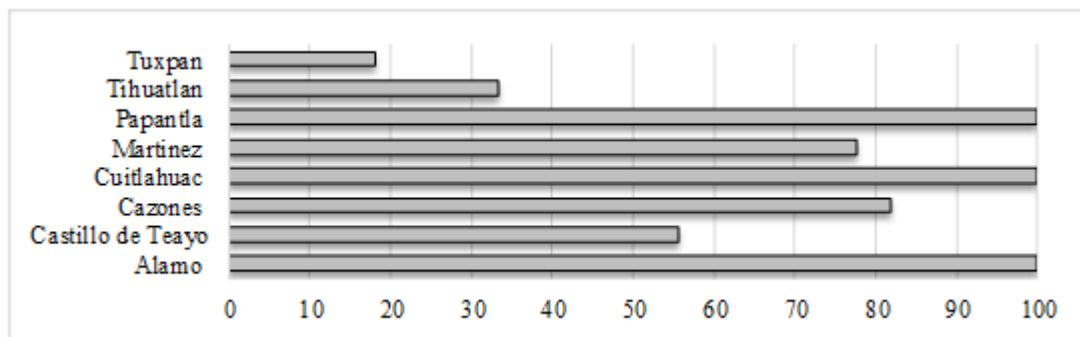
#### **1.3.4 Sequencing and phylogenetic analysis**

The samples that tested positive were sent to MacroGen Corp. for Sanger sequencing. The sequences were assembled with the DNA BASER software and compared with those deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI). Five sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database (MN545966, MN545967, MN545968, MN545969, and MN545970). The phylogenetic analysis was performed with the Neighbor-Joining (NJ) method and the nucleotide substitution model obtained was K2 (Kimura 2 parameters); a bootstrap of 500 repetitions was performed with the MEGA software.

## 1.4 RESULTS AND DISCUSSION

### 1.4.1 Citrus tristeza virus detection

In six out of the eight municipalities, the percentage of samples positive for CTV was higher than 50% (**Figure 1.1**). The reason might be that *C. sinensis* dominates in Alamo, Castillo de Teayo, Cazonas, Papantla, and Tihuatlan, and most of the cultivars from this species produce three vegetative sprouting per year. In contrast, *C. reticulata* (in Tuxpan) produces a single vegetative sprouting per year, while in Cuitlahuac, *C. latifolia*, the prevalent species, has three to four vegetative sprouting affected by the weather. These species then become the preferred hosts for the main vectors (aphids). Our results agree with [90], who mentioned that CTV is semi-persistently transmitted by *A. gossypii*, *T. citricida*, and *T. auranti*, among other aphids. The results for Martinez de la Torre are enigmatic as *C. latifolia* dominates, similarly to Cuitlahuac, yet their outcomes differ; a more intensive technology usage that increases the number of pest control applications might be the reason for this discrepancy.



**Figure 1.1** Incidence (%) of *Citrus tristeza virus* in eight municipalities in Central and Northern Veracruz, Mexico.

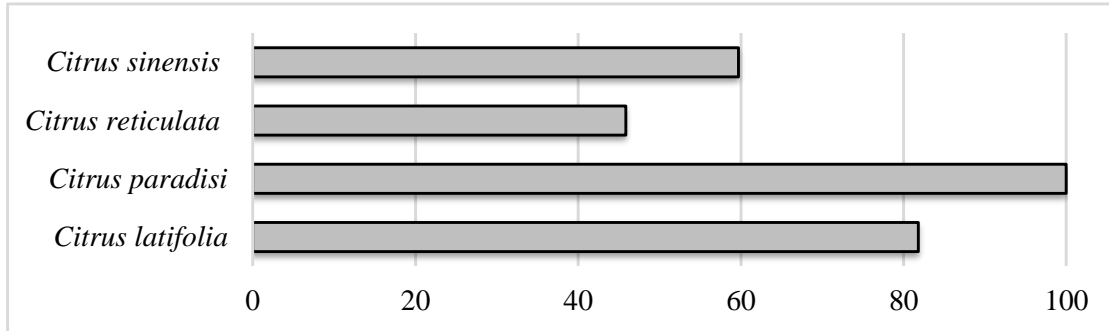
It is essential to indicate that since 1986, [91] mentions CTV detection in Ixtacuaco, Veracruz, a community located on the limits of Martinez de la Torre. The time between

studies (32 years) presumes a higher incidence percentage. This situation occurred in Brazil and Argentina with the brown citrus aphid (*T. citricida*) as a vector, and the rapid spread of the *Citrus tristeza virus* caused the death of millions of trees grafted onto *C. aurantium* in the 1930s and 1940s [92]. In Mexico, CTV was first detected in 1983 and then the primary vector in 2000; it is probably for this reason that it took longer for the disease to spread.

The results obtained in Veracruz coincide with findings in Spain, where the disease took 54 years to become an epidemic as there was no vector; while in Brazil, where a vector existed, the process took five to 10 years [51]. The detection of *T. citricida* in Quintana Roo [93] resulted in predictions of an increase in strains and severe CTV symptoms as in other countries [94]; however, the reasons for the lack of correlation between vector dispersion in Mexico and disease spread are unknown.

The virus may have already infected most producing orchards in the state of Veracruz, but it is necessary to verify this. Extensive surveys are necessary for all citrus-producing areas in Mexico as the virus might be present in other citrus-producing states.

This study found CTV in 100% of the *C. paradisi* samples, followed by *C. latifolia* in 82% of the samples, *C. sinensis* in 60%, and *C. reticulata* in 46% (**Figure 1.2**). Differences in cultivar incidences may depend on various factors that influence the CTV transmission rate, such as cultivars that produce more shoots per year, aphid species and their reproduction rates changing with the local environmental conditions [47], use of non-certified vegetative material, and orchard management (e.g., pruning) with infected tools [95].



**Figure 1.2.** Percentage of positive samples for *Citrus tristeza virus* by species.

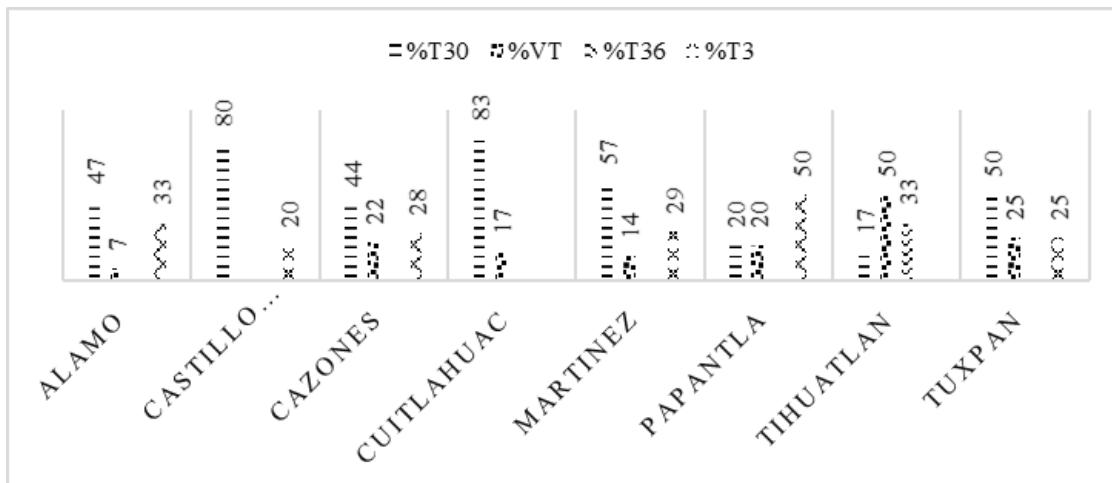
The presence of CTV in all the municipalities and cultivars sampled may result from using infected material as most producers acquired their plants in non-certified nurseries and with sour orange (*C. aurantium* L.) rootstock. Thus, certification programs are essential to prevent the introduction of severe CTV strains or other pathogens associated with citrus. Besides the main insect vectors, four species of aphids have shown the ability to transmit CTV: *A. gossypii*, *A. spiraecola*, *T. aurantia*, and *T. citricida*. The last species mentioned is a highly efficient transmission vector for CTV, up to 25 times. Where *T. citricida* is absent, *A. gossypii* becomes the primary vector of CTV [36, 96, and 97].

Nevertheless, in Mexico, the distribution and transmissibility of CTV, or the main citrus-associated aphids in Central and Northern Veracruz, is not known. A pest currently widely in most citrus-producing areas, *Diaphorina citri*, acts as a CTV vector [98]. In some states of Mexico, given the conditions of humidity, temperature, and alternate hosts, *D. citri* can be found throughout the year [99].

#### **1.4.2 *Citrus tristeza virus* strain detection**

This study employed RT-PCR for five different strains with specific primers: T30, T3, B165, VT, and T36. Out of the 120 samples analyzed, 76 were positive for CTV. All eight

municipalities studied contained the T30 strain (**Figure 1.3**): the incidence ranged from 17% in Tihuatlan to 83% in Cuitlahuac. Thus, all municipalities studied have the disease and, indeed, most other municipalities of Veracruz. Notoriously, visible symptoms do not appear under the T30 strain, even in key lime (*C. aurantifolia* Swingle) indicator plants [100]. The lack of symptoms may explain why no tree deaths have occurred in Mexico.

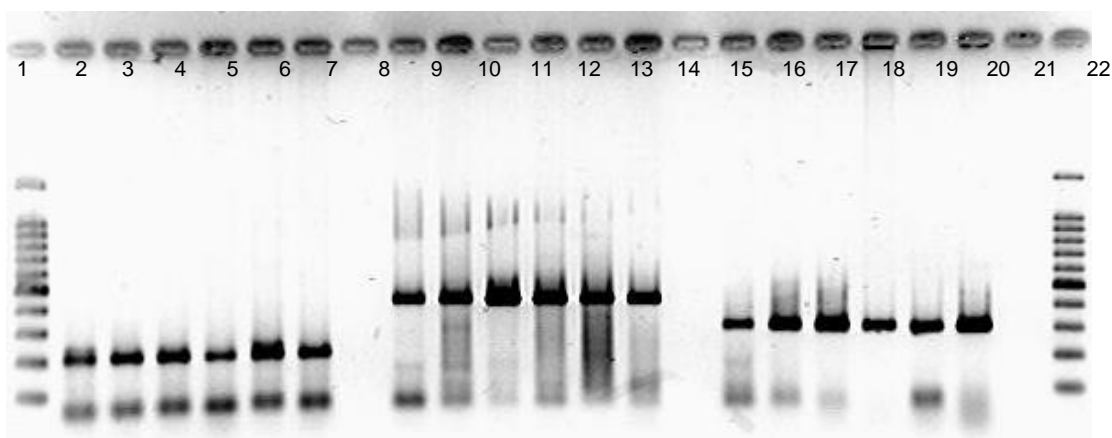


**Figure 1.3.** Incidence of *Citrus tristeza virus* strains in eight municipalities of Veracruz, Mexico.

The VT strain, considered severe [101], was found in seven municipalities, with incidence from 7% in Alamo to 50% in Tihuatlan (**Figure 1.3**). This prevalence might explain the observed tree deaths in the north of Veracruz and put the country's citrus industry at risk since *C. aurantium* is the principal rootstock. Epidemics related to CTV have occurred at different times in Ghana (1938), California (1939), Florida (1951), Spain (1957), Israel (1970), and Venezuela (1980); those countries had *C. aurantium* as a rootstock [102]. We highlight the above as the observed symptoms in the field coincide with those reported in the literature by [12 and 103]: small fruits attached to the plant, defoliation, and quick tree death. The T3 strain was detected in six municipalities, from 20% in Castillo de Teayo to 50% in Papantla.



In Tihuatlan, CTV-positive samples for T30 and VT strains (**Figure 1.4**), also tested positive for T36 (33%), which is considered the most aggressive type worldwide [45 and 101]. All strains are associated with severe leaf symptoms (vein clearing or leaf cupping), mild to moderate stem pitting on all replicates of key lime, as well as little or no stunting (depending on replicate) on this host [104]. Our results conclude that this strain should be present in other municipalities; thus, more exhaustive studies are required.



**Figure 1.4.** Simplex reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Amplicons were obtained from *Citrus tristeza virus* (CTV)-T30 (206 bp), CTV-T3 (409 bp), and CTV-VT (302 bp). Lanes 1 and 22 are 100-bp molecular marker ladder; lanes 2, 9, and 16 were positive controls; lines 3 to 7, 10-14, and 17 to 21 citrus samples; and lanes 8, 15, and 22 were negative controls.

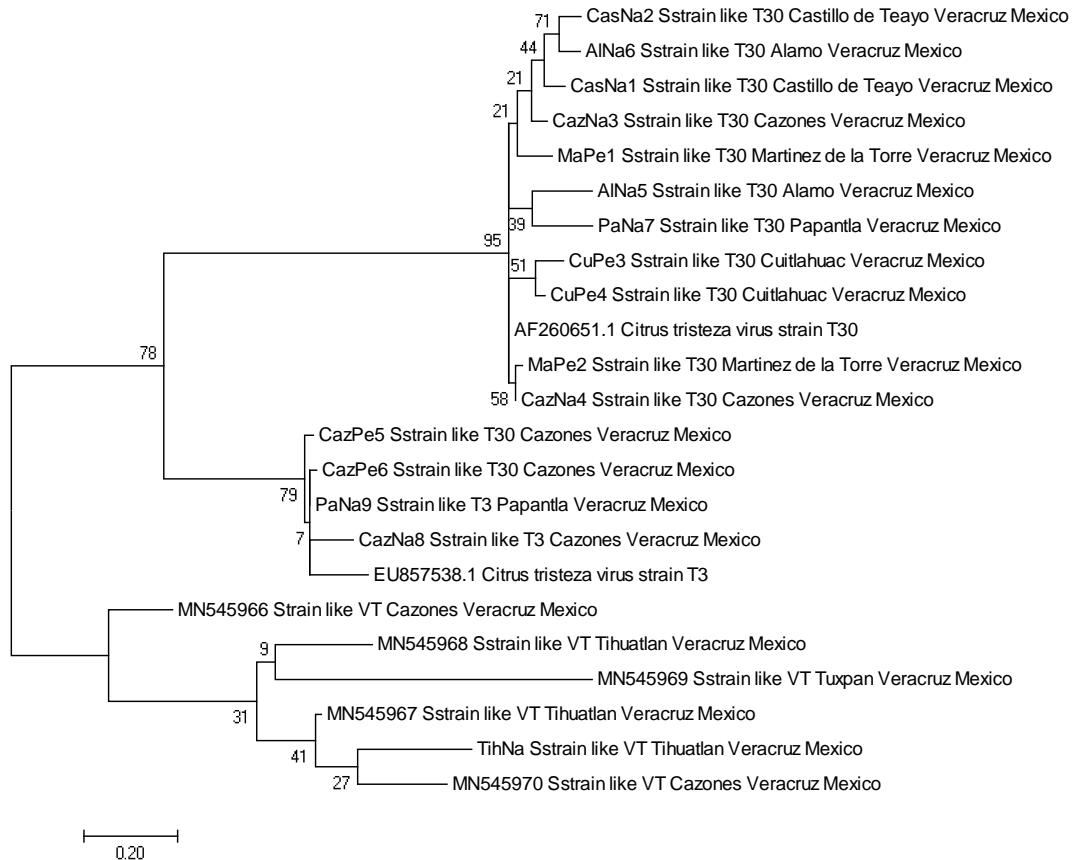
The results indicate rapid progression affecting Veracruz and other producing states; NOM-031-FITO-2000 and NOM-079-FITO-2002 standards, CTV continues spreading. Moreover, in the Mexican citrus orchards, sour orange (*C. aurantium* L.) is the prevailing rootstock, making it even more vulnerable to CTV.

In most municipalities, sampled trees showed yellowing of shoots, leaves, and small fruits, dieback of twigs, and debarking of the trunk and branches. In Cazonles and Tihuatlan, the cultivars sampled corresponded to *C. sinensis* and *C. reticulata*, in most cases grafted

onto *C. aurantium*; current knowledge indicates that CTV symptoms vary depending on the virus strain and the cultivar/rootstock combination [105]. The most often described symptoms are deterioration and death in cultivars of *C. sinensis*, *C. reticulata*, and *C. paradisi*. In *C. aurantium*, "stem pitting" is commonly observed resulting from aberrant phloem development. "Yellowing" is characterized by growth retardation and leaf chlorosis in *C. sinensis* and *C. paradisi* [106]. Aggressive strains and the cultivar/rootstock combination cause tree death and substantially decrease plant yield and vigor, resulting in cumulative economic losses. The CTV positive trees in Cazonas, Cuitlahuac, and Tihuatlan showed yellowing of shoots, leaves, and small fruits, dieback of twigs, and rapid deterioration.

#### **1.4.3 *Citrus tristeza virus* strain phylogeny**

The sequences of each isolate were read in Bioedit, aligned, and compared with GenBank and showed a similarity of up to 100% with CTV strains. For phylogenetic analysis, three sequences (AF260651.1, EU857538.1, and MN545966) were selected. Therefore, based on this analysis, strains of the virus can be detected with specific primers as proposed by Roy et al. [12] for an endpoint RT-PCR. The dendrogram (**Figure 1.5**) shows three groupings: CTV type T30, T3, and VT. The *Citrus tristeza virus* has caused epidemics in citrus cultivation worldwide for two centuries. Strain T36 and VT mainly caused quick tree decline. Stem pitting, often caused by T3 or T68, substantially reduces the growth and fruit quality of *C. paradisi*, *C. sinensis*, and *C. aurantifolia* trees, regardless of the rootstock used, which limits the type of rootstock and varieties that can be grown commercially where these strains are present [12, 36, and 96].



**Figure 1.5.** Phylogenetic reconstruction of the Citrus tristeza virus was inferred using the Maximum Likelihood method based on the Kimura 2-parameter model, with 500 Bootstrap of 23 sequences, 21 from this study, and two CTV sequences from the Gen Bank.

The high incidence of CTV in the prominent citrus-producing municipalities in the state of Veracruz allows us to conclude that: a) producers generally do not use certified material; b) the required prophylactic measures are not applied in the handling of pruning tools; c) The nursery certification program to produce citrus plants used in Mexico is only partially applied. It is vital to acknowledge the current situation in Veracruz, where citrus farming is the basis for the livelihood of more than 50,000 families; furthermore, *C. latifolia* is the primary fruit exported to other countries.

Our results can explain the causes of the accelerated decline of citrus farming in Central-

Northern Veracruz: most sampled plants had damaged trunks, as well as damaged main branches from second to fifth or sixth order, showed psoriasis (CPsV), exocortis (CEVd), cachexia (CVd-II), and HLB (CLas). Additional factors like associated diseases caused by *Phytophthora*, *Lasiodiplodia*, and *Colletotrichum* species and the lack of pruning and fertilization further promote the decline. The effects show particularly on Persian lime, mandarin, orange orchards, and to a lesser extent, grapefruit.

The potential for future citrus losses from CTV is more significant than previously recorded. Therefore, pre-immunization using attenuated strains is the only means to deal with severe *Citrus tristeza virus* strains. According to [107], it has been the best way to control CTV in Brazil, South Africa, Australia, and Japan. Pre-immunization as a management strategy for CTV could resolve one of the phytosanitary problems in Mexican citrus farming. Additionally, the production must be done in certified nurseries and on a scientific and professional basis. In addition, the understanding of the relationship between CTV isolates, plants, and vectors, which in Mexico is scarce, should be strengthened. The combination of the use of certified and pre-immunized buds is undoubtedly the best way to control the losses induced by CTV. Before you begin to format your paper, first write and save the content as a separate text.

## **1.5 CONCLUSION**

The presence of strains like VT in seven of the eight municipalities studied shows the high risk of citrus farming in Central-Northern Veracruz, Mexico. On the other hand, it is necessary to carry out more exhaustive studies to proactively find strains more severe than the VT and T36 strains found in Central-Northern Veracruz.

## **1.6 ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) funding through a fellowship.

## **1.7 CONFLICTS OF INTEREST**

The authors declare no conflicts of interest related to this article and informed consent.

## CAPÍTULO II. OBTENCIÓN DE AISLADOS DE *CITRUS TRISTEZA VIRUS* EN VERACRUZ Y SU POTENCIAL EN LA PROTECCIÓN CRUZADA

### 2.1 RESUMEN

En México se detectó a *Citrus tristeza virus* en 1983 en Tamaulipas y en 1986 en Veracruz. Sin embargo, a pesar de eliminar las plantas positivas, la enfermedad continuó dispersándose debido a que no existían viveros certificados y la producción de planta se realizaba a cielo abierto, aunado a que en la mayoría de las zonas citrícolas se encuentran especies de áfidos capaces de transmitir al virus. Para el manejo de la enfermedad, existen diversas alternativas, la más utilizada es el empleo de portainjertos tolerantes, otra opción de mayor alcance es la protección cruzada, que ha sido usada a escala comercial en Brasil desde 1962 y en Sudáfrica desde 1976 con excelentes resultados. Frente a la actual problemática en el Norte de Veracruz, se planteó la presente investigación, con el objetivo buscar variantes asintomáticas de CTV provenientes de campo y evaluar su potencial para la protección cruzada de naranjo Campbell y lima Persa. Se utilizaron plantas de lima ácida mexicana provenientes de semilla como plantas indicadoras, las cuales fueron asintomáticas cuando tenían dos variantes (T30 + T3). Sin embargo, cuando tenían una variante, mostraron ligero amarillamiento en las hojas o en la nervadura central. Mediante la indexación biológica con *Citrus aurantifolia* se logró conocer el comportamiento biológico de las variantes atenuadas de CTV que pueden utilizarse en programas de protección cruzada para *C. sinensis* y *C. latifolia*, principales especies de cítricos cultivadas en Veracruz. Así también la RT-PCR con iniciadores específicos y secuenciación sanger proporcionaron información sólida para corroborar que se estuvo trabajando con dos variantes de CTV.

**Palabras clave:** Infección asintomática, *Citrus aurantifolia*, protección cruzada

## 2.2 INTRODUCCIÓN

Existen diferentes estrategias para el manejo de enfermedades, dentro de las que destaca la prevención, que consiste en implementar técnicas de manejo antes de la infección para proteger a las plantas del ataque de algún patógeno específico. La utilización de plantas resistentes es considerada como el método ideal para el manejo de enfermedades, con esta práctica se reducen las pérdidas causadas por la infección de patógenos. En cultivos anuales, el uso de plantas resistentes a enfermedades ha sido exitoso; sin embargo, en especies perennes, como los frutales, sigue siendo complicado debido a que se requiere de más tiempo para evaluar la resistencia [108].

En frutales, el uso de portainjertos ha sido una estrategia para controlar enfermedades; en el caso de cítricos fue de uso extensivo en 1836, principalmente por problemas con *Phytophthora* [109], en aguacate desde 1950 [110], en cítricos, para el control de CTV a partir de 1964 [111]. Desafortunadamente, todos los portainjertos utilizados tienen fallas [112], que limitan su supervivencia, así como tolerancia a enfermedades, adaptabilidad o influencia en la productividad o calidad de la fruta [113]. En la actualidad, la forma más eficiente de proteger las variedades comerciales de cítricos ante variantes severas de CTV, es la protección cruzada, con aislamientos asintomáticos de CTV, en variedades importantes como naranjo (*C. sinensis* [L.] Osbeck) cv Pêra en Sao Paulo, Brasil [51] y pomelo (*C. paradisi* Macf.) cv Marsh en Sudáfrica [114].

La protección cruza también ocurre cuando existe antagonismo, interferencia homóloga y exclusión de superinfección. En algunos estudios se ha demostrado que una proteína p33 viral no conservada y una región del extremo 5' que codifica para los RNA

subgenomicos y proteasas son las que median la exclusión entre las variantes del virus [115; 116]. En la última área del genoma viral de CTV es donde se encuentra la mayor diversidad por lo que se supone que modifica a más de un factor que permite al virus primario diferenciarse entre sí mismo y otro y así determinar el resultado de la infección del virus externo [117].

Debido a lo anterior, en los últimos años la protección cruzada ha sido la mejor estrategia para el manejo de enfermedades virales en cultivos perennes. Las plantas son pre inoculadas con una variante de virus que ocasiona síntomas leves o asintomáticos, que mostrarán tolerancia a la infección subsiguiente por variantes del mismo virus o estrechamente relacionados, que causan síntomas severos o incluso la muerte de plantas [57; 118].

La mayoría de las plantaciones cítricas fueron destruidas en Argentina y Brasil de 1930 a 1940 y en Colombia y Perú en 1950, debido a que estaban injertadas en naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), al igual que lo ocurrido en Venezuela y Jamaica (1980) [4]. Lo anterior fue a causa de la enfermedad conocida como tristeza de los cítricos, causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV), un closterovirus con genoma RNA monocatenario de sentido positivo de 20 kb, con 12 marcos abiertos de lectura y regiones no traducibles en las terminaciones 5' y 3' [119]. Los daños causados por CTV han sido considerables en áreas con presencia de aislamientos severos (T36 y VT), que ocasionan rápido decaimiento y picado del tallo en variedades susceptibles. Asimismo, se han observado pérdidas de productividad en pomelos y variedades de naranjo dulce, aun injertados en portainjertos tolerantes [120; 121].



*Citrus tristeza virus* (CTV) causa una de las enfermedades más devastadoras en cítricos y debido a que el uso de portainjertos tolerantes no ha sido la solución para la infección de variantes severas, la protección cruzada es usada para disminuir las pérdidas causadas por CTV. En Brasil desde 1962 se ha realizado la protección cruzada en *Citrus sinensis*, *C. aurantifolia*, *C. latifolia* y *C. paradisi* con un aislamiento atenuado logrando que las plantas no expresen síntomas de tristeza o picado del tallo sin afectar el rendimiento y calidad de los frutos [51; 122].

Estudios recientes señalan la existencia de variantes severas de CTV en las regiones productoras de cítricos de estado de Veracruz [18 y 25]. Estas variantes pueden estar asociadas a las pérdidas registradas en los huertos comerciales donde se han tenido muerte de plantas de cítricos injertadas en portainjertos tolerantes; los riesgos de diseminación de variantes severas a nuevas áreas por áfidos o material vegetativo infectado son reales y deben considerarse; por lo tanto, una estrategia que puede ser eficaz contra dichas variantes es la protección cruzada. En este contexto, se decidió caracterizar biológica y molecularmente variantes atenuadas de CTV con potencial para ser utilizadas en programas de protección cruzada.

## **2.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.3.1 Muestreo y propagación de plantas**

En una primera etapa se colectaron varetas en árboles positivos a las variantes T30 + T3 provenientes de huertos comerciales de *C. sinensis*, *C. latifolia*, *C. reticulata* y *C. paradisi* en los municipios de Cazones y Papantla, Veracruz, México. En cada árbol seleccionado se muestrearon cuatro brotes vegetativos en crecimiento activo y las yemas de estos se

emplearon para injertar 30 plantas de *Citrus volkameriana* como portainjerto de cuatro meses con tallos de 0.5 mm de diámetro.

Las plantas se mantuvieron en jaulas con malla antiáfidos y se evaluaron visualmente por seis meses. En el momento en el que las plantas expresaron brotación y madurez de hojas, se realizaron pruebas de RT-PCR con iniciadores específicos para CEVd, CVd-II, CPsV y CTV así como PCR para *Candidatus Liberibacter asiaticus* para asegurar que las plantas estuvieran infectadas únicamente por las variantes T30 ó T3.

Con la finalidad de identificar variantes atenuadas, se realizó un segundo muestreo de varetas con síntomas leves o infección asintomática en dos municipios. Se identificaron tres árboles (dos en Cazones y uno en Castillo de Teayo), de los cuales se obtuvieron varetas que se injertaron en 10 plantas de limón volkameriano. Un mes después, cuando ocurrió la brotación de los injertos, y posteriormente cada dos meses durante un año, se verificó la identidad de las variantes mediante pruebas de RT-PCR y con evaluaciones visuales de síntomas.

### **2.3.2 Extracción de ácidos nucleicos**

Se realizó extracción de RNA con el protocolo descrito por Contreras-Maya *et al.* [18] para detectar variantes de CTV mediante RT-PCR [21]. En la reacción de transcripción inversa (RT) a cada micro tubo de 0.2 mL se le adicionaron 0.5 µL de cada iniciador (sentido y antisentido) con 4 µL de agua y 2 µL de RNA (200 µg µL<sup>-1</sup>) de cada muestra, se incubaron a 72°C por 5 min en un termociclador (Techne® TC-512); posteriormente, los tubos se colocaron en hielo por 10 min. A cada muestra se le adicionaron 4 µL de la mezcla que contenía 2 µL amortiguador 5X de M-MLV (Promega), 1 µL de DTT 0.1M

(Promega), 0.5 µL de dNTP's Mix (Promega) y 0.15 µL de M-MLV transcriptasa reversa (Promega), los micro tubos se incubaron en termociclador a 42 °C por 60 min seguidos de 72 °C por 10 min.

Para la PCR, a cada micro tubo de 0.2 mL se le agregaron 9 µL del mix que contenía 2 µL de Green buffer GoTaq DNA Polimerasa (Promega), 0.4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µL de dNTP's mix, 0.6 µL de cada iniciador, 0.1 µL de GoTaq DNA Polimerasa (Promega), 5.1 µL de agua libre de DNasa y 2 µL de cDNA. Se siguieron las condiciones de PCR propuestas por Roy *et al.* [12]. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio. Los productos de PCR se enviaron a MacroGen Corp. para secuenciación. Las secuencias fueron ensambladas con el programa DNA BASER y se compararon con las depositadas en el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI).

### **2.3.3 Uso de plantas indicadoras**

Un año después de mantener las plantas en condiciones protegidas, se realizó la indexación biológica, la cual es necesaria para determinar la actividad biológica de un aislamiento de CTV específico, en plantas de lima ácida mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle) provenientes de semilla, especie utilizada como planta indicadora. Las plantas de *C. aurantifolia* de seis meses fueron inoculadas mediante injertos de yemas y trozos de corteza, se ha demostrado que las cepas leves de CTV causan solo picadura leve del tallo y aclaramiento leve de las nervaduras de las hojas.

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.4.1 Detección de patógenos

Durante la primera etapa del estudio, la mayoría de las plantas obtenidas de yemas provenientes de campo resultaron positivas a más de un patógeno, por lo que, todas fueron eliminadas (**Cuadro 2.1**). Los cítricos son hospedantes naturales de viroides como: *Citrus exocortis viroid* (CEVd, género Pospiviroid) que induce descortezamiento en *Poncirus trifoliata*, citrange Troyer y lima Rangpur (*Citrus limonia*), todos ampliamente utilizados como portainjertos [123]. *Hop stunt viroid* (HSVd, CVd-II, género Hostuviroid), causa la enfermedad conocida como cachexia, caracterizada por una decoloración, secreción de goma, oscurecimiento del floema, picado del tallo, agrietamiento de la corteza y retraso del crecimiento en mandarino (*C. reticulata* Blanco) y sus híbridos [124]. Los resultados indicaron la existencia de variantes severas y leves, independientemente de la localidad y especie.

Otra de las enfermedades comunes en cítricos es Huanglongbing (HLB) causada por *Candidatus Liberibacter asiaticus* – CLas, bacteria restringida al floema, no cultivable; esta enfermedad se caracteriza por la formación de brotes amarillos sectorizados, hojas moteadas, frutos pequeños y semillas abortadas [125]. No existen procedimientos curativos efectivos, por lo que su control consiste en evitar que los árboles se infecten. Las mejores prácticas de manejo de estas enfermedades incluyen la prevención, eliminación del inóculo, desinfestación de herramientas y, en el caso de HLB y CTV el control de los vectores.

**Cuadro 2.1.** Detección de patógenos asociados a cítricos en dos municipios de Veracruz durante la colecta de varetas

Procedencia de varetas	Cultivar	CTV	HLB	CEVd	Cachexia	Total de plantas
Primera etapa						
Cazones	<i>C. latifolia</i>	+	+	+	+	6
Cazones	<i>C. sinensis</i>	+	-	+	+	6
Cazones	<i>C. reticulata</i>	+	+	-	+	6
Papantla	<i>C. sinensis</i>	+	+	+	+	6
Papantla	<i>C. paradisi</i>	+	+	+	+	6
Segunda etapa						
Cazones	<i>C. sinensis</i>	+	-	-		10
Cazones	<i>C. sinensis</i>	+	-	-		10
Castillo de Teayo	<i>C. sinensis</i>	+	-	-		10

Los síntomas inducidos por CTV incluyen retraso del crecimiento, picado del tallo, hundimientos en las hojas, aclaramiento de la nervadura y amarillamiento; en ocasiones puede haber infección asintomática según la variante del virus, el momento de la infección, portainjerto, especie, cultivar y condiciones ambientales [8].

#### 2.4.2 Agrupación de plantas de interés

En el proceso de identificación, las plantas se agruparon en tres orígenes tomando en cuenta la procedencia del árbol en: Árbol No. 1, y Árbol No. 2 provenientes del municipio de Cazones y Árbol No. 3 de Castillo de Teayo (**Cuadro 2.2**). Los tres inóculos fueron obtenidos de árboles de *C. sinensis* de huertos comerciales con presencia de CTV tipo T30 ó T3. A pesar de que la PCR es una técnica poderosa, sensible y altamente específica que se ha utilizado de manera cotidiana para identificar virus en cítricos, estos patógenos pueden ser difíciles de detectar debido a su baja concentración o distribución desigual [12; 126].

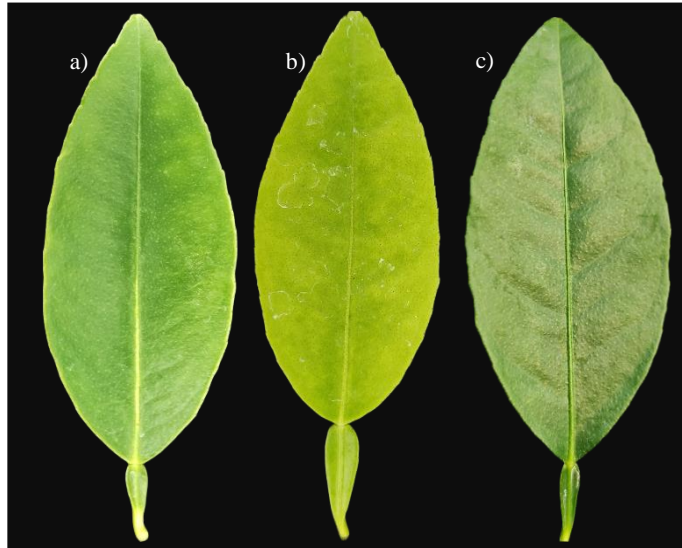
**Cuadro 2.2.** Plantas positivas a variantes de CTV injertadas con varetas de tres procedencias

Procedencia del inóculo	Municipio	T30	T3	T30 + T3
Origen 1 (árbol No. 1)	Cazones	1	2	7
Origen 2 (árbol No. 2)	Cazones	2	3	5
Origen 3 (árbol No. 3)	Castillo de Teayo	1	1	8

### 2.4.3. Prueba biológica

Las inoculaciones por injerto de yema y de corteza en *C. aurantifolia* para evaluar la patogenicidad [40], fueron eficientes para la transmisión de CTV. Las plantas mostraron amarillamiento ligero cinco meses después de la inoculación, especialmente las que solo tenían una variante (**Figura 2.1**). Un mes después de inocular las plantas, el 50 % resultaron positivas a CTV y hasta los tres meses que todas las plantas fueron positivas por RT-PCR.

Se observaron plántulas con brotes amarillos en todos los árboles de naranjos que tenían una variante, mientras que en las plantas de limón mexicano se observó aclaramiento severo de las nervaduras. Sin embargo, cuando se inocularon con ambas variantes, las plantas indicadoras fueron asintomáticas.



**Figura 2.1.** Síntomas en hojas de *Citrus aurantifolia* inoculados con CTV. a) aclaramiento de nervadura; b) clorosis generalizada; c) hoja asintomática

#### **2.4.4 Exclusión de superinfección**

La infección por un virus preexistente para prevenir una infección posterior por el mismo virus se denomina exclusión por superinfección. El principio de este fenómeno es limitar la multiplicación de dos o más genomas de virus relacionados en la misma célula [10]. Se ha demostrado que la exclusión por superinfección es conferida por proteínas producidas por el virus primario al infectar una célula huésped, algunas de las cuales bloquean la infección y multiplicación del virus secundario [127; 128 y 129]. Es por ello que se decidió trabajar con dos variantes para evaluar su respuesta en la inoculación de plantas indicadoras de lima ácida mexicana.

Estudios recientes revelan una coinfección de las variantes VT y T3 así como de VT + T30 + T36) [18 y 130], lo cual sugieren que la diversidad genética de CTV es amplia. Folimonova *et al.* [131] demostraron que la exclusión de una superinfección por CTV es

específica; es decir, que una variante de CTV dada, genera protección hacia otras del mismo tipo.

La exclusión de superinfección por CTV es una función activa controlada por el virus, es un proceso que previene la infección por una variante de virus estrechamente relacionada [132]; sin embargo, debido a que las plantas en campo frecuentemente presentan mezclas de diferentes variantes, sería valioso desarrollar protección cruzada de amplio espectro, creando una protección contra múltiples variantes.

## **2.5 CONCLUSIÓN**

Se identificaron, propagaron y aislaron plantas positivas a las variantes T30 + T3 con potencial para ser utilizadas en protección cruzada. Con base en los resultados obtenidos, se establece que la infección de las variantes T30 + T3 puede ser utilizada como una alternativa para el manejo de variantes severas de CTV.

## **2.6 AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue apoyado por fondos de CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) a través de una beca, al igual que las instalaciones y equipos del COLPOS (Colegio de Postgraduados - Campus Montecillo). Al vivero Cazonas, por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de trabajo en espacio protegido.

## **2.7 CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses relacionados con este artículo y consentimiento informado.



## **CAPÍTULO III. RESPUESTA FOTOSINTÉTICA DE *CITRUS SINENSIS* Y *CITRUS LATIFOLIA* INOCULADOS CON *CITRUS TRISTEZA VIRUS* VARIANTES T30 Y T3**

### **3.1 RESUMEN**

*Citrus tristeza virus* (CTV) es uno de los patógenos más importantes en la citricultura, causa pérdidas significativas en el rendimiento de *Citrus sinensis* y *Citrus latifolia*, especies de importancia económica en México. El control de este virus se realiza comúnmente con el uso de portainjertos tolerantes, pero cuando se tienen variantes severas de CTV, la forma más adecuada de manejo es la protección cruzada, técnica utilizada en Brasil desde 1962, Sudáfrica (1976), Japón (1960), Perú (1970) y Estados Unidos de Norteamérica (1980). Debido a que en México se han detectado variantes severas, es necesario implementar esta estrategia para la citricultura del futuro en nuestro país, por lo que, el objetivo de esta investigación fue determinar si las variantes T30 + T3 de CTV, obtenidas de árboles asintomáticos, tienen potencial de usarse en protección cruzada. Se registraron los síntomas y se realizó RT-PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados. Para la caracterización biológica se utilizaron plantas de *C. aurantifolia* como planta indicadora. Las variantes T30 + T3 de CTV no causaron reducción en la capacidad fotosintética. Sin embargo, la transpiración y conductancia fueron mayores en las plantas inoculadas en comparación con las testigos. La densidad estomática y el tamaño de estomas variaron de acuerdo con la especie. Las plantas testigo presentaron estomas más anchos y largos. Los resultados sugieren que las inoculaciones con las variantes T30 + T3 de CTV brindan protección a las plantas de naranja Campbell y lima Persa, ya que fueron asintomáticas incluyendo las plantas indicadoras. Hasta la fecha ningún estudio ha examinado la posibilidad de utilizar dos variantes en la protección cruzada como alternativa de manejo de variantes severas de CTV.

**Palabras clave:** Densidad estomática, fotosíntesis, protección cruzada

### 3.2 INTRODUCCIÓN

Los cítricos se consideran dentro de los frutales más importantes a nivel mundial, se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales en más de 140 países [133] con producción superior a los 38 millones de toneladas. Los principales países productores son: China, Brasil, India, México, Estados Unidos de Norteamérica y España [134].

En México, la superficie cultivada de cítricos es de 571,175 ha y la producción de 8,548,845 t y es el segundo exportador de limón a nivel mundial [134 y 135]; sin embargo, las plantaciones de cítricos son afectadas por patógenos, dentro de los cuales *Citrus tristeza virus* (CTV) es uno de los más destructivos, especialmente en especies del género *Citrus* [136].

La enfermedad conocida como tristeza de los cítricos ha causado la muerte de millones de árboles en Argentina, Brasil, Sudáfrica, Estados Unidos de Norteamérica y España; continúa propagándose a nuevas áreas, ya sea por yemas infectadas o transmitidas por áfidos [90].

El CTV causa tres síntomas principales: tristeza (decline), picado del tallo (SP) y amarillamiento de plántulas (SY). La severidad es variable dependiendo del hospedante, variantes del virus y diferentes tipos de estrés abióticos que actúan sobre la planta [105 y 137]. Aunque es sabido que la infección viral ocasiona alteración de la fisiología de las plantas, es poca la información del efecto de la infección causada por CTV en la maquinaria fotosintética.

Las formas comunes de hacer frente a la enfermedad hasta el día de hoy han sido la utilización de portainjertos tolerantes y en algunos casos el manejo de vectores. Otra

medida ha sido la protección cruzada que consiste en disminuir los daños ocasionados por la infección de variantes severas del virus mediante la pre-inoculación con aislados que causan síntomas leves o asintomáticos del mismo virus. En Brasil desde 1962 han empleado la protección cruzada a escala comercial como control de CTV, lo que ha permitido la producción de cítricos hasta la fecha, en Sudáfrica desde 1976; recientemente se está impulsando en California [2; 66 y 138], lo anterior muestra que la citricultura del futuro requiere de la protección cruzada para disminuir los daños ocasionados por variantes severas. Se sabe que CTV se encuentra en la planta infectada como una mezcla de variantes que difieren en sus propiedades biológicas y severidad [139; 140]. La diversidad genética y reacciones biológicas que genera este virus, hace necesario conocer las características de las variantes, para implementar un programa de protección cruzada.

La fotosíntesis es uno de los aspectos fisiológicos más importantes de las plantas que es afectada negativamente por estrés causado por factores bióticos o abióticos [141]. La reducción en la actividad fotosintética durante el estrés por patógenos da como resultado disminución de la síntesis de clorofila e inhibe las actividades del ciclo de Calvin, ya sea directa o indirectamente [142].

Las plantas que enfrentan estrés biótico, como una infección viral, reaccionan aumentando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno),  $O_2^-$  (superóxido) y radicales OH (hidroxilo) debido a la mayor fuga de electrones al oxígeno molecular [143 y 144]. Las ROS pueden actuar como vía de transducción de señales, pero la producción excesiva puede causar estrés oxidativo, que daña las estructuras de las plantas [144].

Los estomas son estructuras especializadas que funcionan como válvulas para el intercambio de gases, están formados por dos células protectoras que rodean al poro y unen los espacios intercelulares del interior de la hoja a la atmósfera; permite que el dióxido de carbono llegue a los cloroplastos del mesófilo, para producir reacciones fotosintéticas [145]. También pueden ser importantes en la infección por patógenos como hongos, bacterias y nematodos, permitiendo su penetración a la planta. En los últimos años se reconoce que los estomas forman parte del sistema de defensa innato de las plantas [80 y 146]. A diferencia de lo que ocurre con los hongos y bacterias, existe poca información con relación a infecciones virales, su influencia en la densidad de estomas y con ello en el metabolismo de las plantas.

Murray *et al.* [81] demostraron que la densidad estomática (DE) se redujo 12.3 % en plantas susceptibles de *Arabidopsis thaliana* inoculadas con TVCV (*Turnip vein clearing virus*), mientras que en plantas de *Chenopodium quinoa* tolerantes a TVCV la reducción de la DE no fue significativa.

De esta manera, el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto de la inoculación de plantas de *Citrus latifolia* y *Citrus sinensis*, así como de *Citrus aurantifolia* como planta indicadora; con CTV tipo T30 + T3 en condiciones protegidas, en el norte de Veracruz. En este contexto, se realizaron pruebas de RT-PCR y se midieron parámetros fisiológicos en las tres especies de cítricos para evaluar su potencial uso en protección cruzada de naranjo Campbell y lima Persa.

### 3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó con naranjo Campbell (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) y lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) injertadas en limón volkameriano (*Citrus volkameriana* Pasq.). La lima ácida mexicana (*Citrus aurantifolia* Swingle) proveniente de semilla se utilizó como planta indicadora. El experimento se realizó en el norte de Veracruz en condiciones de invernadero, con plantas positivas a CTV tipo T30 + T3.

#### 3.3.1 Plantas empleadas

Se recolectaron varetas de árboles de naranjo previamente identificados como positivos a CTV tipo T30 + T3, se injertaron en *C. volkameriana* y se evaluaron de manera visual cada 15 días; se confirmó la presencia de CTV (T30 + T3) al año del injerto mediante RT-PCR y secuenciación Sanger; posteriormente, se eligieron tres plantas de diferente procedencia, las cuales fueron las donadoras de yemas y corteza para realizar las inoculaciones en las plantas.

Cinco plantas de naranjo Campbell, cinco de lima Persa (0.8 cm de diámetro c/u) y lima ácida mexicana (0.5 cm) provenientes de semilla, se inocularon en la parte media del portainjerto, por cada origen de inóculo. Las inoculaciones se realizaron por medio de yemas y parches (corteza), un mes después de ser inoculadas, se confirmó la presencia de CTV (T30 + T3) y posteriormente, se realizaron verificaciones cada tres meses durante un año.

### 3.3.2 Extracción de RNA y RT-PCR

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo el protocolo propuesto por Contreras-Maya *et al.* [18]. Las muestras se analizaron por RT-PCR con los iniciadores T30-F, T30-R y T3-F, T3-R [12]. En la reacción de transcripción inversa (RT) a cada tubo microtubo de 0.2 mL se adicionaron 0.5  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (F y R) con 4  $\mu\text{L}$  de agua y 2  $\mu\text{L}$  de RNA ( $200 \mu\text{g} \mu\text{L}^{-1}$ ) de cada muestra, se incubaron a 72 °C por 5 min en un termociclador (Techne® TC-512). Posteriormente, los microtubos se colocaron en hielo por 10 min. A cada muestra se le adicionaron 4  $\mu\text{L}$  del mix que contenía 2  $\mu\text{L}$  amortiguador 5X de M-MLV (Promega), 1  $\mu\text{L}$  de DTT 0.1M (Promega), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's Mix (Promega) y 0.15  $\mu\text{L}$  de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega), los microtubos se incubaron en termociclador a 42 °C por 60 min seguidos de 72 °C por 10 min.

Para la PCR, a cada microtubo de 0.2 mL se le agregaron 9  $\mu\text{L}$  del mix que contenía 2  $\mu\text{L}$  de Green buffer GoTaq DNA Polimerasa (Promega), 0.4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{L}$  de dNTP's mix, 0.6  $\mu\text{L}$  de cada iniciador (F y R), 0.1  $\mu\text{L}$  de GoTaq DNA Polimerasa (Promega), 5.1  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas y 2  $\mu\text{L}$  de cDNA. Se siguieron las condiciones de PCR propuestos indicadas por Roy *et al.* [12]. Los productos fueron visualizados en un gel de agarosa 2% con bromuro de etidio.

### 3.3.3 Secuenciación y análisis filogenético

Los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones (sentido y antisentido) en Macrogen Corp. (Corea del Sur). Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el software BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.2.6, se realizó la comparación de las secuencias mediante el Basic Local Alignment Search Tool (BLAST®), en la base de

datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Para realizar la filogenia del CTV, se descargaron del GenBank las secuencias de las variantes T30 y T3. Todas las secuencias consenso se compilaron en formato FASTA. El alineamiento múltiple de secuencias se efectuó con la aplicación MUSCLE, incluido en el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis v7 (MEGA), donde se cortaron los extremos de las mismas. El análisis filogenético se hizo con el método de Neighbor-Joining (NJ) y el modelo de sustitución de nucleótidos que se obtuvo fue K2 (Kimura 2 parámetros), se realizó un “bootstrap” de 500 repeticiones.

### **3.3.4 Variables fisiológicas evaluadas**

Se evaluaron fotosíntesis, número y tamaño de estomas y crecimiento en las plantas 12 meses después de la inoculación. El crecimiento (longitud y diámetro) se midió con un calibrador vernier digital std y mm (TRUPER) y flexómetro magnético 5Mx19mm (TOOLCRAFT) antes de ser inoculadas y un año después.

La tasa fotosintética se cuantificó por medio de un sistema portátil de análisis de gases IRGA (LI-6400/XT, Li-cor, Lincoln, Nebraska, USA). Para ello, un año después de la inoculación y en cada árbol, cuatro por tratamiento, se seleccionó una hoja madura situada en rama del último flujo de crecimiento, para realizar las mediciones de fotosíntesis en las plantas. Las evaluaciones se hicieron de las 12:00 a las 13:00 horas.

### 3.3.5 Tamaño y densidad de estomas

La cuantificación de estomas se realizó a partir de impresiones epidérmicas de las superficies abaxiales de hojas maduras completamente expandidas (correspondientes al flujo de crecimiento anterior). Las impresiones se realizaron utilizando pegamento instantáneo KOLALOKA BROCHA (México), distribuido uniformemente en la parte media a cada lado de la nervadura central; después, la parte de la hoja con pegamento se presionó sobre portaobjetos; un minuto después, la hoja se desprendió con cuidado. Se tomaron imágenes con microscopio Tessoar (Carl Zeiss, Germany) con cámara Canon EOS 100D en combinación con lente Canon EF-S 60 mm f/2.8 Macro USM.

La densidad estomática (DE) corresponde al número de estomas por unidad de superficie foliar. Es una variable que está influenciada por la especie vegetal, así como por factores bióticos y abióticos con el programa Image J se realizó el conteo de estomas por campo, utilizando el objetivo 10X. Se hicieron dos impresiones por hoja, y se fotografió un campo por impresión. Se evaluaron 10 campos por tratamiento. El área del campo fue de 1.4 mm<sup>2</sup>. La densidad se expresó en número de estomas por mm<sup>2</sup>. En cuanto al largo y ancho de estomas, se midió la longitud y ancho de diez estomas por campo (40X), obteniendo por cada tratamiento 100 mediciones con el programa ImageJ y su tamaño se expresó en µm.

Los datos de cada una de las variables se les realizaron análisis de varianza y prueba de comparación de medias DSH (diferencia significativa honesta), según el procedimiento de Tukey, ambas con  $P \leq 0.05$ , a través del paquete computacional Statistical Analysis System (SAS).



## 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.4.1 Síntomas de plantas inoculadas

No se observaron síntomas evidentes en naranjo Campbell y lima Persa. Müller *et al.* [49] y Leonel *et al.* [138] mencionan que las variantes de CTV que pudieran servir para protección cruzada no causan síntomas en *C. sinensis*, únicamente ligero amarillamiento en *C. aurantifolia*, misma que ha sido utilizada como planta indicadora al mostrar los síntomas típicos de la infección por CTV [147 y 148].

En el presente estudio, todas las plantas inoculadas de lima ácida mexicana desarrollaron síntomas muy leves durante el experimento consistente en amarillamiento ligero de las nervaduras de hojas (**Figura 3.1**). Besoain *et al.* [101] realizaron la caracterización biológica de las variantes de CTV, donde la lima ácida mexicana se utilizó como planta indicadora y encontraron que algunas variantes atenuadas causaron amarillamiento de las nervaduras. Por otro lado, en estudios efectuados en Pakistán se menciona que es indispensable llevar a cabo la indexación biológica en *C. aurantifolia* para evaluar variantes de CTV con potencial para utilizarse en protección cruzada [149]. Diversos estudios han demostrado que muchas enfermedades virales disminuyen la fotosíntesis debido a la reducción de los pigmentos fotosintéticos [150].

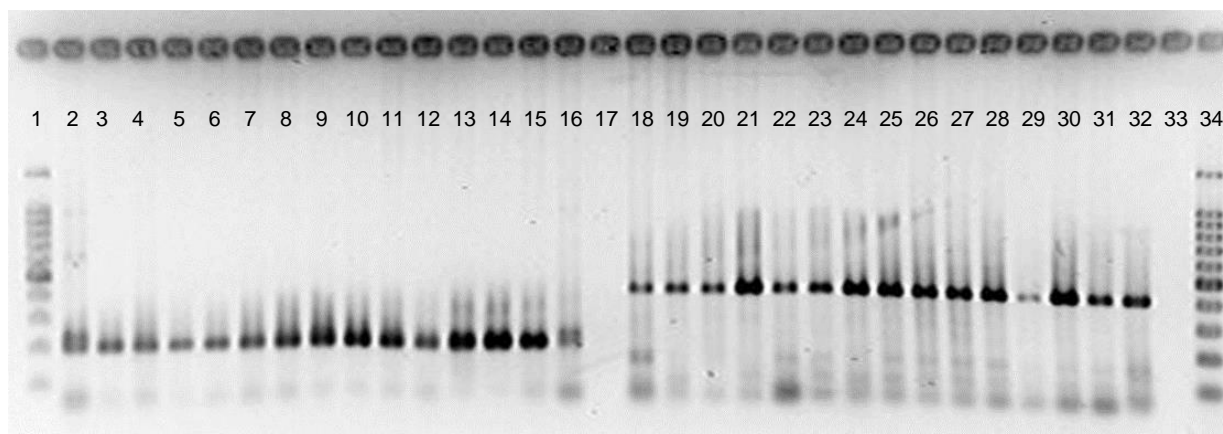


**Figura 3.1.** Hojas de lima ácida mexicana cinco meses después de la inoculación. a) testigo, b) inoculado con CTV T30 + T3.

Como se ha mencionado anteriormente, las plantas infectadas con el virus de la tristeza de los cítricos muestran síntomas como: decaimiento repentino, picado del tallo de naranjos dulces injertados en naranjo agrio, aun cuando sean variantes atenuadas. En cambio, lima ácida mexicana muestra ligero aclaramiento de las nervaduras cuando se infecta con variantes atenuadas del virus [90 y 137], los síntomas observados coincidieron con lo reportado por Garnsey *et al.* [139]; Hančević *et al.* [144] y Soler *et al.* [147] que consistieron en ligero amarillamiento de las nervaduras, por lo que biológicamente se consideraron como variantes atenuadas. El uso de medios biológicos para comprobar la existencia o ausencia de CTV ha sido una herramienta útil y eficaz para identificar la severidad de la enfermedad.

La presencia de CTV (T30 + T3) en una misma planta fue detectada un mes después de la inoculación, posteriormente cada tercer mes hasta cumplir dos años. Con el objetivo de asegurarse que no tuvieran otra variante del virus en estudio u otro patógeno, se

realizaron RT-PCRs con iniciadores específicos a todas las plantas, consecutivamente geles de agarosa para visualizar los fragmentos esperados (**Figura 3.2**).



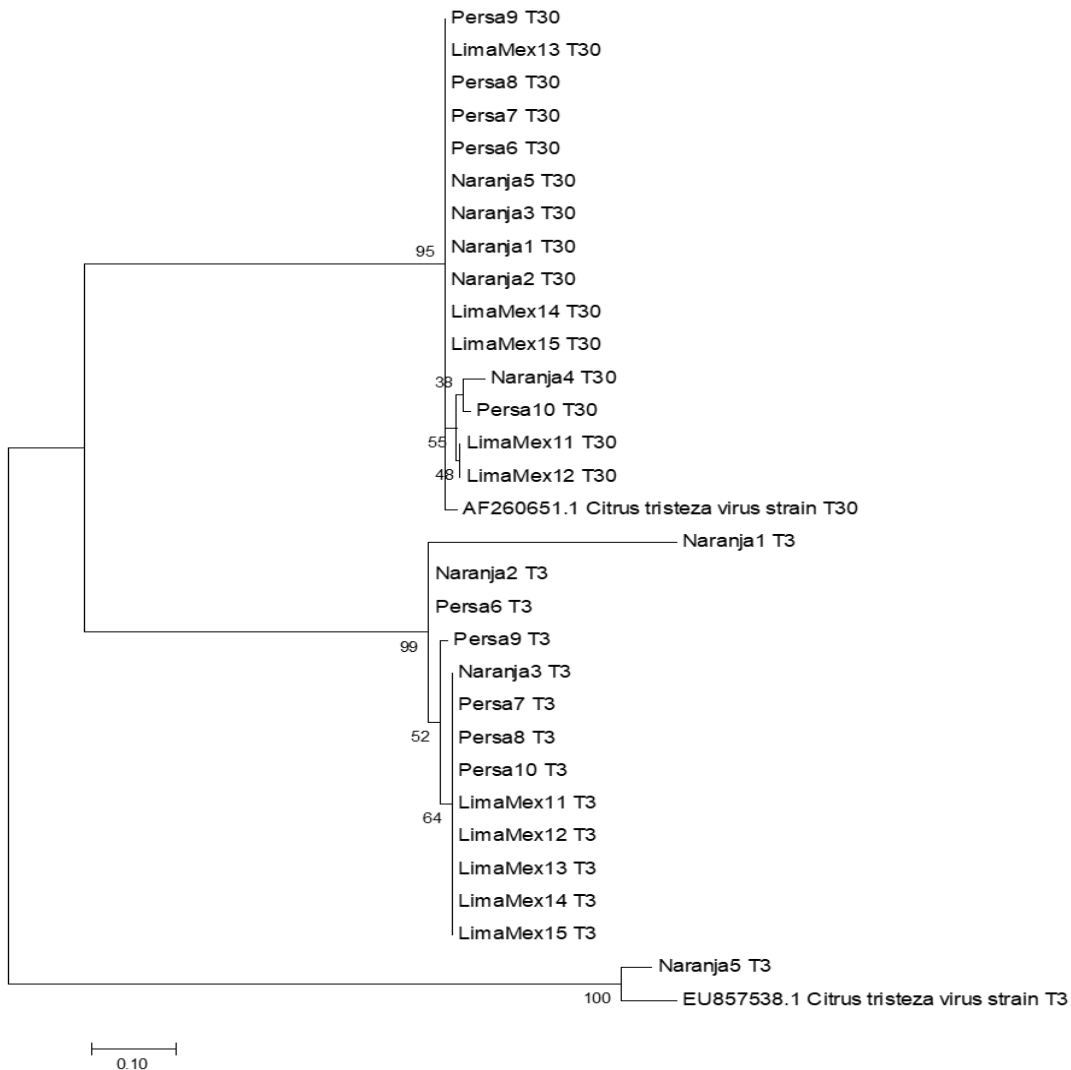
**Figura 3.2.** Gel de agarosa 2% de productos de RT-PCR de plantas de cítricos inoculadas con T30 + T3. Carriles 1 y 24 marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2 y 18 controles positivos T30 (206 pb) y T3(409 pb) respectivamente [22]; carriles 3-6 muestras de naranjo Campbell; carriles 7-14 lima Persa; carriles 12-16 lima ácida mexicana; carriles 17 y 33 controles negativos, carriles 19-22 naranjo Campbell; carriles 23-27 lima Persa y carriles 28-32 lima ácida mexicana.

### 3.4.2 Análisis filogenético

En el dendrograma de la **Figura 3.3** se muestra la similitud de cada una de las secuencias en estudio con las secuencias tipo T30 y T3. Las muestras tuvieron 92-99% de similitud con *Citrus tristeza virus* genoma completo de tipos T30 y T3, números de acceso: AF260651.1 y EU857538.1.

El virus de la tristeza de los cítricos se destaca de otros virus por la diversidad de variantes que presenta, cuyas características difieren genética y biológicamente. Para poder distinguirlos filogenéticamente, es necesario realizar análisis de secuencias. Las muestras analizadas formaron tres grupos: uno con más del 95 % de similitud a la secuencia tipo T30 con 15 plantas: cinco de naranjo, cinco de lima persa y cinco de lima

ácida mexicana. El segundo agrupamiento consistió en tres secuencias de naranjo, cinco de lima persa y cinco de lima acida mexicana con 99% de similitud entre ellas. Por ultimo un tercer grupo donde solo una secuencia de naranjo se alinea con 100% de similitud con la secuencia tipo T3.



**Figura 3.3.** Reconstrucción filogenética de Citrus tristeza virus (T30 + T3) máxima verosimilitud basado en el modelo de Jukes-Cantor (JC). Probabilidad logarítmica más alta (-427,4200) y 500 repeticiones de Boostrap de 31 secuencias, 29 de este estudio y dos secuencias de CTV de referencia del GenBank.

El análisis de secuencias utilizando genomas completos de variantes de CTV de todo el mundo, reconoció seis variantes de CTV: VT, T36, T30, T3, RB y T68 [9 y 10]. Los

estudios de diversidad genética de CTV se basan en el análisis de las secuencias de nucleótidos del fragmento 5' ORF1a y el gen de la cubierta proteica (CP) [84 y 151].

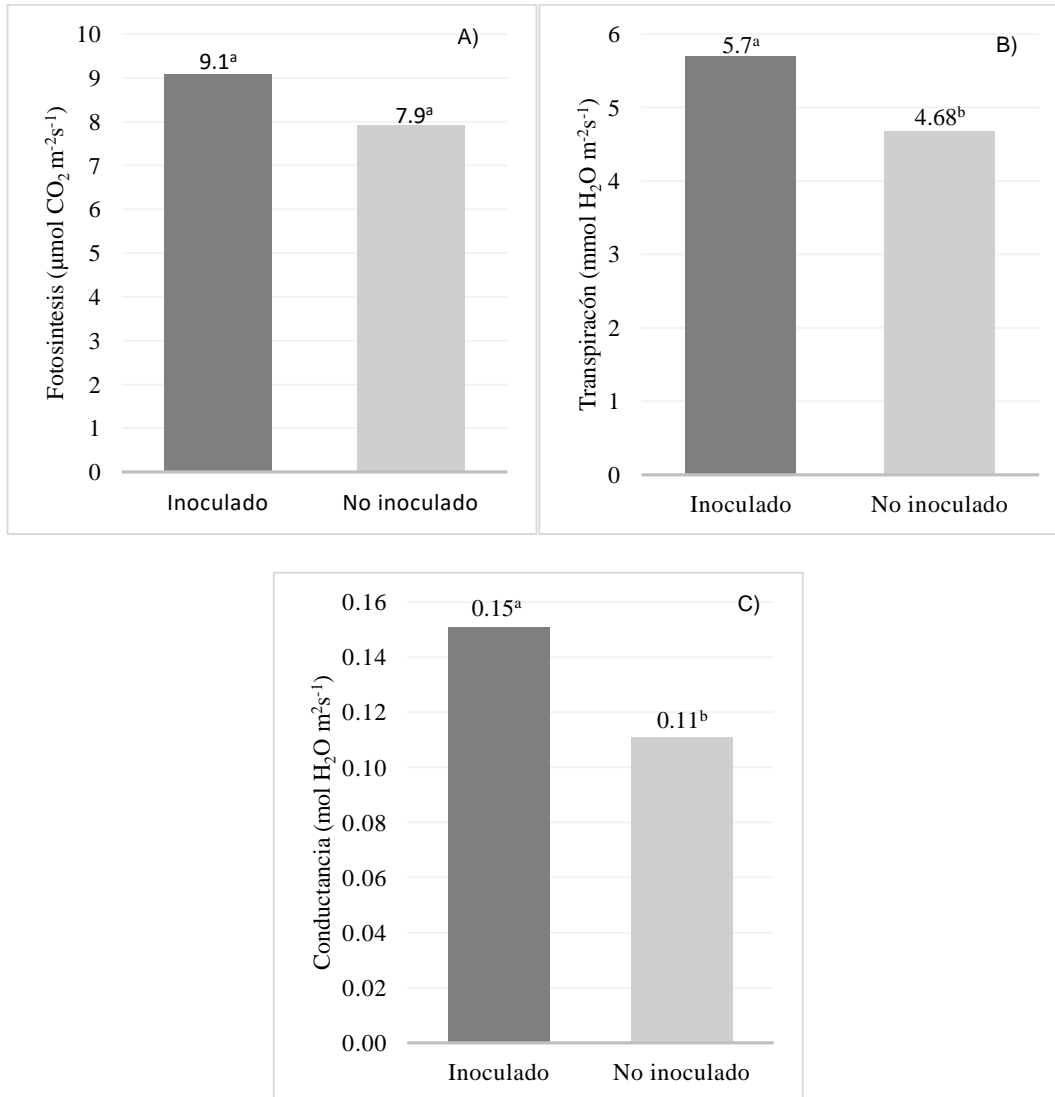
### 3.4.3 Fotosíntesis en plantas inoculadas

Las inoculaciones con CTV (T30 + T3) no afectaron significativamente la tasa de fotosíntesis neta, pero sí la conductancia y transpiración **Figuras 3.4A, B y C**; Lima ácida mexicana tuvo valores mayores en fotosíntesis, conductancia y transpiración en comparación con naranjo Campbell y lima Persa. El aumento de la síntesis de enzimas antioxidantes puede aclimatar a las plantas al estrés posterior como el causado por una infección viral sistémica. El equilibrio entre la producción de ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes determina si se producirán señales oxidativas o daños [144; 152].

Olarte-Ortiz *et al.* [153] encontraron que, en árboles de naranjo de ocho años, la tasa de asimilación de CO<sub>2</sub> fue de 3-4  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  antes de la floración y mayor a 10  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$  durante el período de fructificación; sin embargo, en este caso fueron plantas de año y medio y la tasa fotosintética varió de 8 a 9  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , tanto en plantas inoculadas como en los testigos (**Figura 3.4A**) sin importar la especie de cítrico.

Si se considera la especie, lima ácida mexicana fue la que tuvo mayor asimilación de CO<sub>2</sub> (9.59  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) en comparación con naranjo Campbell que tuvo 7.63  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Ribeiro *et al.* [154] mencionaron que en las plantas de naranjo dulce infectadas por *Xylella fastidiosa*, el potencial hídrico de la hoja, asimilación de CO<sub>2</sub>, transpiración y conductancia estomática tendieron a disminuir; sin embargo, en la presente investigación utilizando dos variantes de CTV ocurrió lo contrario, lo que indica

que los inóculos utilizados podrían emplearse para la protección cruzada de *C. sinensis* y *C. latifolia*.



**Figura 3.4.** Valores medios de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática en tres especies de cítricos (*C. sinensis* [L.] Osbeck, *C. latifolia* Tanaka y *C. aurantifolia* Swingle) inoculadas con las variantes T30 + T3 de CTV. A) comparación de tasa fotosintética, B) transpiración, C) conductancia en plantas inoculadas y no inoculadas. Letras diferentes en las columnas denotan diferencias significativas en  $P < 0.05$  en cada variable.

### 3.4.4 Transpiración y conductancia estomática

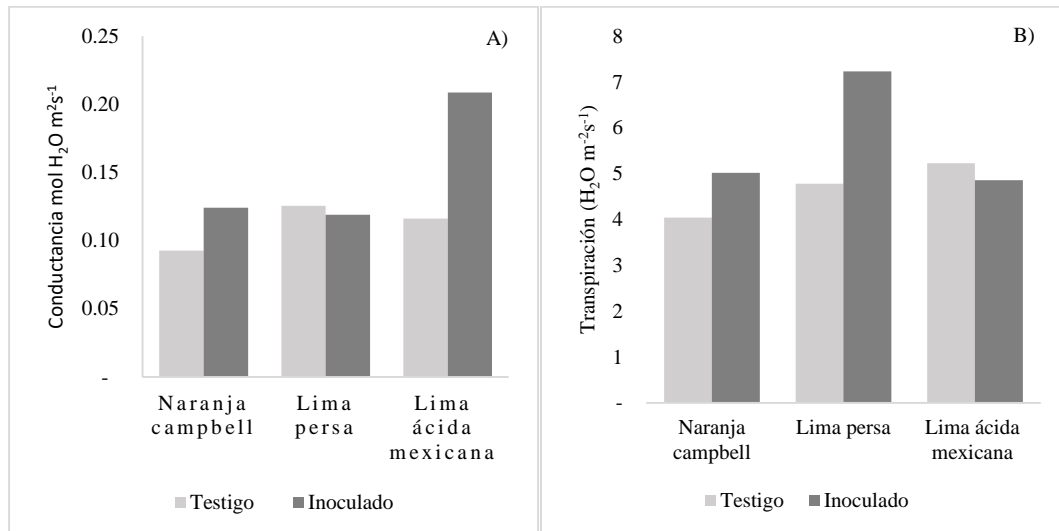
Diversos autores señalan que existe correlación entre fotosíntesis y conductancia estomática debida al cierre estomático, como respuesta al estrés hídrico [155 y 156]. Ante un aumento del déficit de presión de vapor, las plantas regulan su nivel de transpiración controlando la apertura de estomas, tratando de mantener el potencial de agua de los tejidos y la integridad del xilema [157].

Se ha observado que la fotosíntesis neta disminuye por la infección de virus al igual que los procesos dependientes de la luz, de las reacciones de los tilacoides, conductancia estomática o actividad de las reacciones de fijación de carbono del ciclo de Calvin [158 y 159].

La disminución fotosintética puede variar sustancialmente según la especie, cultivar y virus. Debido a que algunas variantes de CTV causan cambios visibles en la coloración y turgencia de las hojas, es razonable suponer que la disminución fotosintética inducida por virus podría estar asociada con reducciones en la conductancia estomática y posiblemente la actividad de las reacciones en tilacoides; en el presente trabajo se encontró que tanto la fotosíntesis como la conductancia y transpiración tuvieron valores elevados en las plantas inoculadas en comparación con los testigos.

Por otro lado, los parámetros de conductancia y transpiración en las plantas inoculadas de lima ácida mexicana y naranjo Campbell se incrementaron, mientras que en lima Persa disminuyó **Figura 3.5A**, donde los promedios de conductancia en las plantas inoculadas de lima ácida mexicana ( $0.21 \text{ mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ) fue mayor que las de naranjo Campbell y lima Persa ( $0.12 \text{ mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ), mientras que en las plantas testigo (sin

inocular), los valores fueron menores: naranja Campbell ( $0.09 \text{ mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ), lima ácida mexicana ( $0.12 \text{ mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ) y lima Persa ( $0.13 \text{ mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ).



**Figura 3.5.** Conductancia estomática y transpiración en tres especies de cítricos inoculadas y no inoculadas con CTV (T30 + T3). A) conductancia ( $\text{mol H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ), B) transpiración ( $\text{H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ).

En algunas investigaciones se ha demostrado que el estrés salino disminuye la fotosíntesis neta y conductancia estomática, afectando la disponibilidad de  $\text{CO}_2$  para la carboxilación [160] y dicha respuesta también la podría causar un virus ya que para que cause infección sistémica debe multiplicarse y existir interacción de las proteínas virales con las proteínas vegetales y ocurrir la supresión de las respuestas de defensa de la planta hospedante a la infección viral [161].

En el caso de la transpiración (**Figura 3.5B**), plantas inoculadas de lima ácida mexicana y naranja Campbell tuvieron valores de  $7.23$  y  $5.01 \text{ H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ , respectivamente, en comparación con los testigos (naranja Campbell  $4.04$  y lima ácida mexicana  $4.78 \text{ H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ), en lima Persa, el valor medio en plantas inoculadas fue menor ( $4.86 \text{ H}_2\text{O m}^2\text{s}^{-1}$ ),

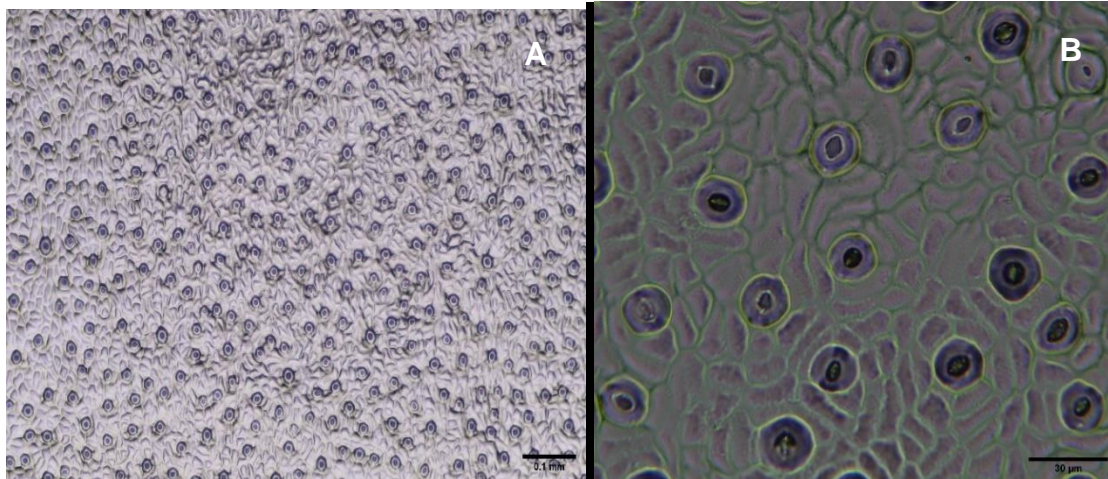


mientras que en los testigos el promedio fue de  $5.23 \text{ H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . La tasa de transpiración afecta el movimiento del virus a través de la vía apoplástica y transporte horizontal desde el floema hacia los tejidos circundantes [162]. Con los resultados obtenidos se puede decir que la inoculación tuvo efecto en la conductancia y transpiración, principalmente en las plantas de lima ácida mexicana y naranjo Campbell, sin afectar la fotosíntesis.

### **3.4.5 Densidad estomática en plantas inoculadas**

La asimilación de dióxido de  $\text{CO}_2$  a través de las aberturas de los estomas, conduce a pérdidas inevitables de agua por transpiración. La compensación entre fotosíntesis y transpiración se refleja en la eficiencia del uso del agua [163]. Las plantas reaccionan ante cualquier estrés ya sea de origen biótico o abiótico, a través de una serie de respuestas como disminución en la conductancia de los estomas, con lo cual se evita la pérdida de agua por transpiración, abscisión y área foliar y, por tanto, la superficie de transpiración, y adaptaciones a nivel metabólico y osmorregulación [164].

En cítricos, los estomas se encuentran generalmente en el envés de las hojas; consisten en un poro microscópico central rodeado por dos células protectoras (**Figura 3.6**). Cuando las células protectoras están completamente turgentes, los poros se abren y ocurre la absorción de  $\text{CO}_2$  para la fotosíntesis, así como la pérdida de agua por evapotranspiración; en condiciones de estrés severo pueden llegar a cerrarse, restringiendo el intercambio de  $\text{CO}_2$  y pérdida de agua [81].



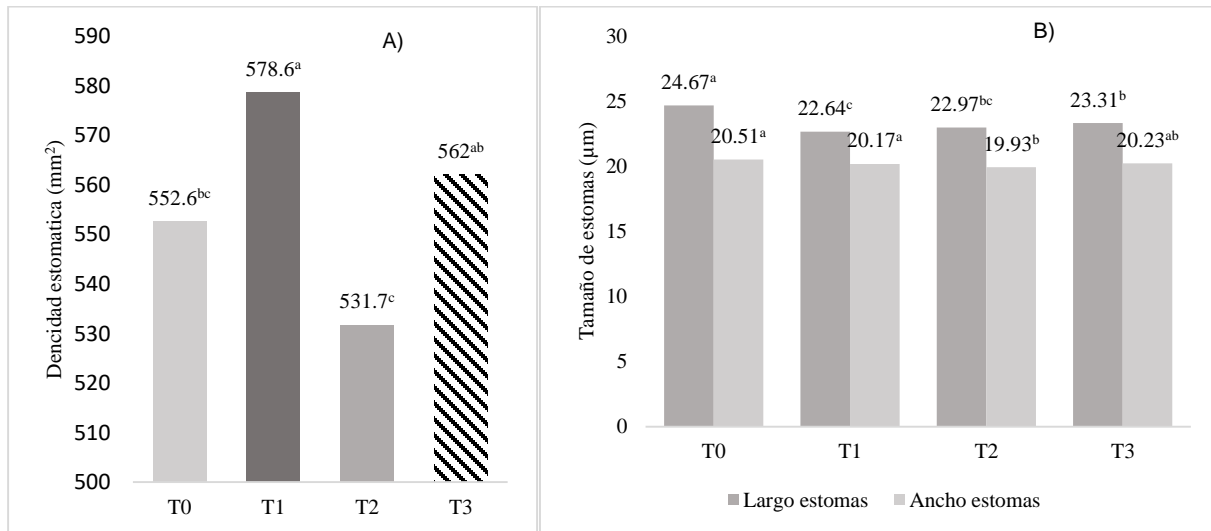
**Figura 3.6.** Estomas de hojas de cítricos. A) Microfotografía a 10X para contar estomas; B) Microfotografía a 40X para la medición de estomas.

Perez-Clemente *et al.* [165], demostraron que la capacidad fotosintética de las plantas de limón mexicano infectadas con CTV (T318) se redujo después de la infección, en el presente estudio no se encontraron cambios en las tasas fotosintéticas, transpiración y conductancia estomática en plantas inoculadas con T30 + T3. Dichos resultados coinciden con los de Hančević *et al.* [144], donde evaluaron por 10 años plantas de limón mexicano inoculadas con CTV, sin encontrar diferencias en fotosíntesis y transpiración en comparación con las no inoculadas.

La densidad estomática (DE) varió con la especie, sobresaliendo lima ácida mexicana con 602.55 estomas por  $\text{mm}^2$ , mientras que T1: Naranja1 de Rancho nuevo tuvo 578.6 estomas por  $\text{mm}^2$  (**Figura 3.7A**). Se ha documentado que la reducción de la densidad estomática podría ser una opción del hospedante susceptible para evitar mayor infección viral, lo que indica que se trata de una respuesta sistémica [76 y 81].

Tomando en consideración la especie, los estomas de lima Persa fueron más largos y anchos en comparación con los de naranja Campbell y lima ácida mexicana; sin

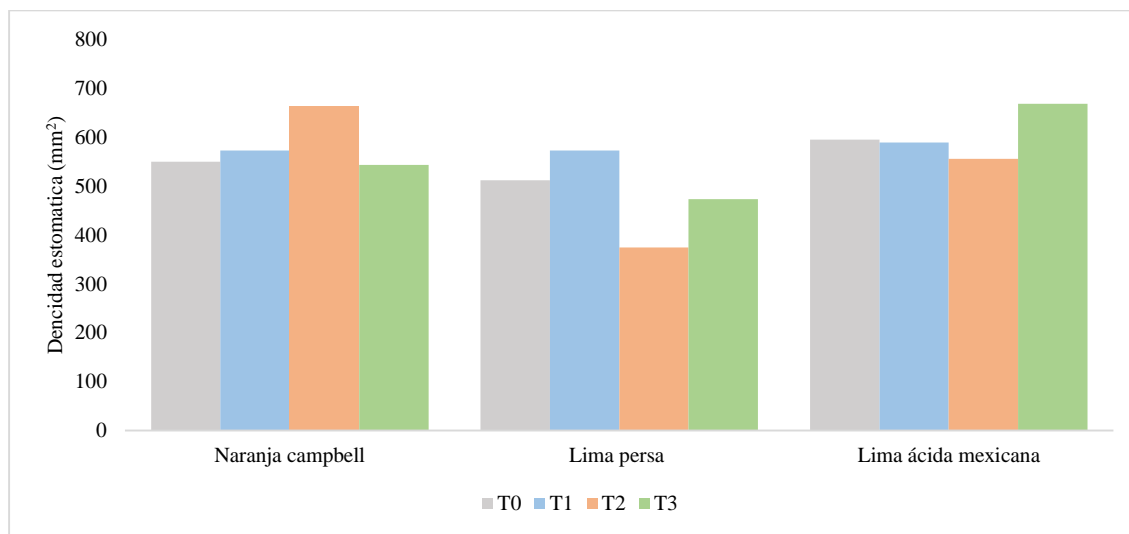
embargo, la inoculación tuvo efecto significativo, puesto que analizando por tratamientos, en T0 (testigo), se encontraron los estomas más largos (**Figura 3.7B**). Los estomas pequeños presentan respuesta más rápida, comparados con estomas grandes, y combinados con alta densidad estomática, muestran mayor conductancia en condiciones desfavorables [166].



**Figura 3.7.** Densidad estomática en *C. sinensis* [L.] Osbeck, *C. latifolia* Tanaka y *C. aurantifolia* Swingle inoculados con CTV (T30 + T3) de tres procedencias. A) valores medios del número de estomas por mm<sup>2</sup>; B) tamaño de estomas (largo y ancho); medias con letras diferentes en las columnas denotan diferencias significativas en  $P < 0.05$  en cada variable.

El número de estomas fue diferente entre especies. Sin embargo, la procedencia del inóculo utilizado afectó esta variable (**Figura 3.8**); en lima Persa, los tratamientos T2 y T3 tuvieron en promedio 374.6 y 473.6 estomas por mm<sup>2</sup> respectivamente, el testigo tuvo 512 estomas por mm<sup>2</sup> y T1 573 estomas por mm<sup>2</sup>. Berdeja-Arbeu *et al.* [167] mencionan que lima Persa injertado en limón volkameriana tiene en promedio 328 estomas por mm<sup>2</sup>.

En lima ácida mexicana T0 (595.5 estomas  $\text{mm}^2$ ) se comportó casi igual que T1 (589.6 estomas por  $\text{mm}^2$ ), mientras que T2 (556.3 estomas por  $\text{mm}^2$ ) fue menor y T3 obtuvo el valor más alto (668.8 estomas por  $\text{mm}^2$ ). En el caso de naranjo Campbell, el menor promedio se registró en T3 (543.6 estomas por  $\text{mm}^2$ ), mientras que el testigo presentó 550.1 estomas por  $\text{mm}^2$ , siguiéndole T1 con 573.1 estomas por  $\text{mm}^2$  y el sobresaliente T2 con 664.2 estomas por  $\text{mm}^2$  (**Figura 3.8**). En investigaciones realizadas por Arrieta-Ramos *et al.* [168] encontraron que las hojas de naranjo Campbell injertada en limón volkameriana tuvieron en promedio 106 estomas por  $\text{mm}^2$ .



**Figura 3.8.** Densidad estomática medida en naranjo Campbell, lima Persa y lima ácida mexicana. Tres fuentes de inóculo T30 + T3: T0: Testigo sin inocular, T1: Naranjo 1 Rancho nuevo, T2: Naranjo 2 Rancho nuevo, T3: Naranjo 3 Castillo de Teayo.

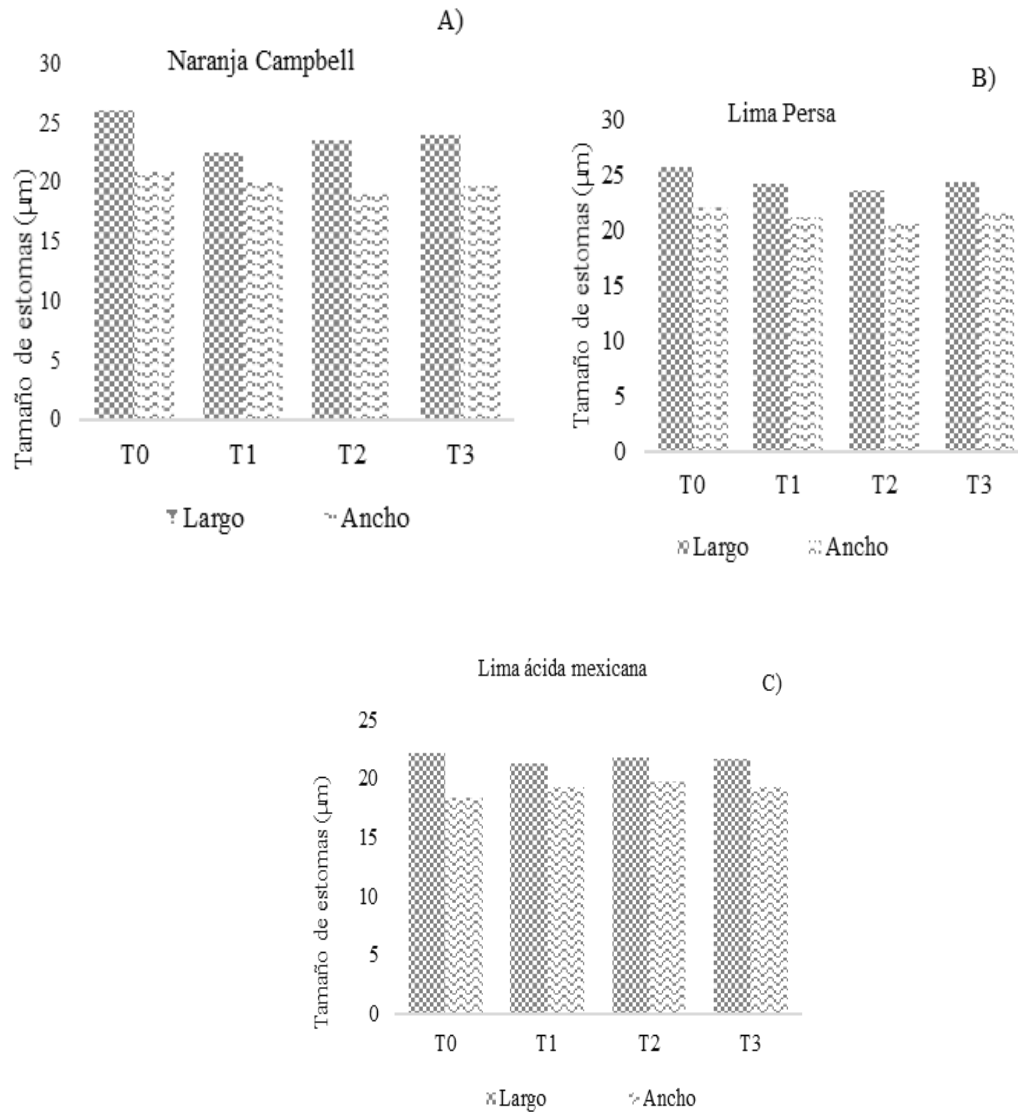
Es conocido, también, que los estomas son fundamentales en la regulación de la transpiración basada en su densidad y mecanismo de cierre capacita a la planta para controlar las pérdidas de agua en condiciones de estrés ambiental. Aún se desconoce si la reducción en el índice estomático es respuesta de defensa de la planta o benéfica para

el virus durante la infección; de hecho, se ha informado recientemente que la reducción en densidad e índice de estomas probablemente estaría asociada con transpiración reducida y mayor eficiencia en el uso del agua por parte del hospedante [169].

### 3.4.6 Dimensión de estomas

En el testigo (T0) se obtuvieron los estomas más grandes en las tres especies: naranjo Campbell: 26.1  $\mu\text{m}$ , lima Persa: 25.7  $\mu\text{m}$ , lima ácida mexicana: 22.2  $\mu\text{m}$ ), en comparación con T1, T2 y T3 donde los valores fueron menores a 24.3  $\mu\text{m}$  en las tres especies (**Figura 3.9**). Arrieta-Ramos *et al.* [168] encontraron que naranjo injertado en limón volkameriano tenía estomas que median en promedio 23.92  $\times$  19.99  $\mu\text{m}$  (largo  $\times$  ancho); mientras que Berdeja-Arbeu *et al.* [167] mencionaron que en lima Persa / limón volkameriano, la longitud fue 24.67  $\mu\text{m}$ . La infección por virus generalmente causa alteraciones morfológicas y fisiológicas en las plantas infectadas [170]. En el presente estudio, se redujo el tamaño de los estomas y sería importante saber si esta reducción afecta la fotosíntesis y con ello el rendimiento.

El ancho de estomas medio fue mayor en lima Persa (22  $\mu\text{m}$ ) y naranjo Campbell (21  $\mu\text{m}$ ) del tratamiento T0; sin embargo, en lima ácida mexicana T0 (18.4  $\mu\text{m}$ ) fue menor en comparación con T1, T2 y T3 (**Figura 3.9**). Con los resultados obtenidos es posible afirmar que el virus afecta el tamaño de los estomas. En este estudio fueron más largos y anchos en lima persa, en comparación con naranjo Campbell y lima ácida mexicana.



**Figura 3.9.** Tamaño medio (largo y ancho  $\mu\text{m}$ ) de estomas en tres especies de cítricos. A) *Citrus sinensis*, B) *Citrus latifolia*, C) *Citrus aurantifolia*.

El intercambio de gases, representado por el transporte de  $\text{CO}_2$  y vapor de agua impulsado por la fotosíntesis, respiración y transpiración, es un proceso fisiológico fundamental en las hojas y está involucrado en el suministro de energía y compuestos necesarios para varios procesos metabólicos. La infección por virus a menudo afecta la actividad fotosintética y apertura de los estomas [76]; sin embargo, tales efectos negativos no se observaron con las variantes de CTV utilizados.

### **3.5 CONCLUSIÓN**

La tasa fotosintética, transpiración y conductancia estomática no se afectaron en *Citrus sinensis* y *Citrus latifolia*, inoculadas con CTV variantes T30 + T3. En las plantas indicadoras la conductancia y transpiración fueron mayores en comparación con naranjo y lima persa.

En las plantas de *Citrus aurantifolia* inoculadas con las variantes T30 + T3 no hubo disminución en la densidad estomática.

El origen del inóculo afectó la densidad de estomas. T1, presentó mayor número de estomas que el testigo.

Con relación a las especies; naranjo presentó mayor número de estomas con T2, lima persa en T1, mientras que, limón mexicano con T3.

La inoculación con las variantes T30 + T3 de CTV encontrados en el norte de Veracruz podrían brindar exclusión por superinfección de naranjo Campbell y lima Persa injertados en limón volkameriano ante variantes severas.

### **3.6 AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo fue apoyado por fondos de CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) a través de una beca, al igual que las instalaciones y equipos del COLPOS (Colegio de Postgraduados - Campus Montecillo). Al vivero Cazonas, por todas las facilidades prestadas para el desarrollo de trabajo en espacio protegido.

### **3.7 CONFLICTO DE INTERESES**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses relacionados con este artículo y consentimiento informado.



## DISCUSIÓN GENERAL

*Citrus tristeza virus* ha sido considerada una de las enfermedades más devastadoras, probablemente originaria de Asia y diseminada a otras regiones cítricas a través de material vegetal y vectores. Ha causado grandes pérdidas en las plantaciones donde el portainjerto es naranjo agrio en Argentina (1930), Brasil (1937), California (1939), Florida (1951), España (1957), Israel (1970) y Venezuela (1980). Después empezaron a surgir variantes denominadas severas y débiles del virus; el clásico decaimiento repentino (quick decline) que induce el colapso de naranjo injertado en naranjo agrio ha sido asociado con variantes severas, mientras que, las variantes asintomáticas en portainjertos tolerantes o que generan amarillamiento ligero son consideradas débiles (mild) [8].

En México las primeras detecciones de CTV fueron en Tamaulipas (1983) y después en Veracruz (1986), y fue hasta 2003 cuando se encontraron variantes severas [20]; desde entonces han transcurrido 20 años aproximadamente y seguramente se han incrementado debido a la variabilidad genética del virus. En Brasil en 1960 surgieron brotes de variantes severas y al año siguiente (1961) empezaron a trabajar en estrategias de control por medio de la protección cruzada en los cultivares de naranjo Pêra y limon Galego. Para 1977 se llevaron a campo más de cinco millones de plantas preinoculadas con variantes débiles [51 y 171].

La estrategia para resolver el problema del control de la tristeza fue y sigue siendo la protección cruzada; es decir, la inoculación de plantas desde vivero con variantes débiles, que brindan protección contra variantes severas. Al principio, el control de la enfermedad

en el centro y norte del Estado de São Paulo, en las plantaciones de naranjo Pêra fue exitosa al utilizar la variante Pêra IAC, con la cual se ha controlado de manera eficiente las variantes severas de CTV, logrando así efecto protector y estable por más de 35 años [49]. En México no se habían realizado pruebas de protección cruzada, aun cuando se trata de uno de los principales países productores de cítricos, y se sabía de la presencia de variantes severas en Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz desde 2003 [18; 20 y 25].

La protección cruzada con complejos de variantes débiles de *Citrus tristeza virus* permitió el cultivo comercial de naranjo dulce Pêra, variedad importante para la citricultura brasileña, pero susceptible al virus. El uso de variantes débiles puede realizarse tanto en cultivares susceptibles como tolerantes a CTV y puede ser de interés para prevenir la propagación de variantes severas [94]. Estas evidencias dejan claro que la protección cruzada es una alternativa eficiente de manejo para las variantes severas de CTV. En México, actualmente no se realizan análisis para detectar al virus en la misma cantidad como solía hacerse, quizá porque no existen programas o centros de investigación continua y específica para cítricos.

Los mejores resultados de protección cruzada se obtienen cuando las variantes débiles de CTV se seleccionan en la misma región donde se usarán; por ejemplo, el clon Citrovita del Programa Superplant se comporta bien en el sudeste de São Paulo, donde se produce el complejo CTV de Capão Bonito [172 y 173]. Este conjunto de factores constituyó la justificante de esta investigación para la búsqueda y evaluación de variantes débiles o atenuadas que proporcionen protección ante la aparición de variantes severas en el estado de Veracruz, México. Sin embargo, hay que resaltar que en campo pueden ocurrir mutaciones, recombinación de secuencias de distintas variantes por presión de

selección y flujo de genes como consecuencia de repetidas inoculaciones por el vector o por material vegetal infectado en campo.

El síntoma más común ocasionado por virus fitopatógenos es la clorosis de la hoja, que refleja la alteración de la pigmentación y cambio estructural de los cloroplastos. La infección viral afecta la estructura y funciones de los cloroplastos con lo que generalmente se disminuye la actividad fotosintética. Desde la primera mitad del Siglo XX, se conoce que la infección viral inhibe la fotosíntesis y con esto se manifiesta en diferentes síntomas [174; 175 y 176]. La alteración de los componentes y funciones del cloroplasto puede ser responsable de la producción de síntomas de clorosis que se asocian con una infección viral [177]. En el presente trabajo, las plantas inoculadas con las variantes tipo T30 + T3 fueron asintomáticas, característica deseable si pretenden utilizarse en programas de protección cruzada.

En cuanto a la densidad estomática, no hubo diferencias significativas entre los testigos y las plantas inoculadas, existen supuestos donde se sugiere que los cambios anatómicos hacia menor densidad o tamaño de los estomas también pueden limitar la colonización de patógenos, debido a que tales cambios en el desarrollo podrían reducir permanentemente la capacidad de intercambio de gases durante la vida de la hoja [178], sin embargo, en este estudio no se presentaron cambios, por lo que se asume que tampoco se afectó la fotosíntesis; en consecuencia, las variantes T30 + T3 pueden ser utilizadas para la protección cruzada en naranjo Campbell y lima Persa. También se menciona que los estomas controlan el intercambio de gases y son ruta para la infección de los tejidos internos por parte de algunos patógenos foliares, lo que establece el

potencial de compensación entre la fotosíntesis y colonización de patógenos; sin embargo, se requiere de más estudios para corroborarlo.

## CONCLUSIONES GENERALES

En México existen variantes severas de *Citrus tristeza virus*, denominadas VT y débiles como T3 y T30, por lo que es factible la búsqueda de alternativas de manejo eficientes para la implementación de un programa de protección cruzada para hacer frente a esta enfermedad que en los últimos años ha cobrado importancia en la citricultura mexicana.

Se requieren más investigaciones para descubrir el posible mecanismo de tolerancia a enfermedades de las plantas de cítricos. El perfil de antioxidantes en respuesta a una infección viral puede ayudar a descubrir nuevos biomarcadores para dar seguimiento al desarrollo de la enfermedad.

La dispersión de CTV en México ha sido continua y las pérdidas por este patógeno han sido considerables a lo largo del tiempo y podrían ir en aumento; además, la dispersión de vectores y utilización de planta no certificada son factores que han aumentado la propagación de la enfermedad; con dicha perspectiva la industria citrícola mexicana cambiara drásticamente.

## REFERENCIAS

- [1] Segura, C. B. (1952) La “tristeza” de los cítricos en el Perú. Informe n° 77. Centro Nacional de Investigación y Experimentación Agrícola La Molina, Lima, Perú pp. 14.
- [2] Müller, G.W. and Rezende, J.A.M. (2004) Preimmunization: applications and perspectives in virus disease control. pp. 361–395. In: Naqvi, S.A.M.H., ed. Diseases of Fruits and Vegetable-Diagnosis and Management 1. Kluwer, Amsterdam, Netherlands.
- [3] Mendt, (1992) History of CTV in Venezuela. In: Proc. of a Workshop on Citrus Tristeza Virus and *Toxoptera citricidus* in Central America Development of Management Strategies and use of Biotechnology for Control (eds. Lastra, R., Lee, R..F, Rocha – Peña, M., Niblett, C., Ochoa, F., Garnsey, S.M., and Yokomi, R.K.) Maracay, Venezuela, pp. 137-142.
- [4] Roistacher, C.N. (1999) A report on a technical visit and consultancy to Jamaica. May 16 –21.FAO, Rome.
- [5] Lee, R.F., Barber, W., Brown, L.G., Kesinger, M., Garnsey, S.M. and Schirard, B. (1997) Is Meyer lemon a threat to citrus. *Citrus Ind.* 78: 46–50.
- [6] Lee, F.L. and Keremane, L. (2013) Mild strain cross-protection of tristeza: a review of research to protect against decline on sour orange in Florida. *Frontiers in Microbiology* 4(259): 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00259>
- [7] Rocha-Peña, M.A., Lee R.F., Lastra, R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garsney, S.M., and Yokomi R.K. (1995) Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*: Threats to citrus production in the Caribbean and Central and North America. *Plant Disease* 79 (5):437-445. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0437>
- [8] Moreno, P. Ambrós, S. Albiach-Martí, M.R., Guerri, J, and Peña, L. (2008) *Citrus tristeza virus*: pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology* 9(2): 251–268. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>
- [9] Harper, S.J. (2013) *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology* 4(93): 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>
- [10] Melzer, M.J., Borth, W.B., Sether, D.M., Ferreira, S., Gonsalves, D. and Hu, J.S. (2010) Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes* 40:111–118. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0409-3>
- [11] Biswas, K.K., Tarafdar, A., Diwedi, S., and Lee, R.F. (2012) Distribution, genetic diversity and recombination analysis of *Citrus tristeza virus* of India. *Virus Genes* 45(1):139–148. <https://doi.org/10.1007/s11262-012-0748-3>

- [12] Roy, A., Ananthkrishnan, G., Hartung, J.S. and Brlansky, R.H. (2010) Development and application of a multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of *Citrus tristeza virus* isolates. *Phytopathology* 100(10): 1077–1088. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-10-0102>
- [13] Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F. and Niblett, C.L. (1992) Effect of mild isolates of *Citrus tristeza virus* on the development of tristeza decline. *Subtropical Plant Science* 45: 11–17.
- [14] Loeza-Kuk, E., Ochoa-Martínez, D., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Gutiérrez-Espinosa, A. Cintra de Jesús Junior, W., Villegas-Monter, A. and Arno Wulff, N. (2008) Acquisition of CSDAV and haplotypes of *Citrus tristeza virus* by *Toxopetera citricida* and *Aphis spiraecola* and the implication on Citrus Sudden Death. *Agrociencia* 42: 669-678.
- [15] Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Domínguez-Monge, S., and Lomas-Barrie, C.T. (2017) Chronic infection of the *Citrus tristeza virus* in *Citrus sinensis*/*C. aurantium* trees in a restrictive thermal regime in Yucatán. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3): 187-202. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.028>
- [16] Herrera-Isidró, L., Ochoa-Sánchez, J.C., Rivera-Bustamante, R. and Martínez-Soriano, J.P. (2009) Sequence diversity on four ORFs of citrus tristeza virus correlates with pathogenicity. *Virology Journal*, 6(116): 1-16. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-116>
- [17] Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Ruiz-García, N., Ochoa-Martínez, D.L., Gutiérrez-Espinosa, A. and Febres, V. (2010) Análisis espacio-temporal de aislamientos del *Citrus tristeza virus* de Yucatán y Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(4): 493-507.
- [18] Contreras-Maya, R., Villegas-Monter, A., Santacruz-Varela, A., Cruz-Huerta, N., Ortega-Arenas, L.D. and Ochoa-Martínez, D.L. (2022) Prevalence of mild T30, T3, and severe VT strains of *Citrus tristeza virus* in Central-Northern Veracruz, Mexico. *American Journal of Plant Sciences* 13: 494-505. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.134032>
- [19] Silva-Vara, S., Peña del Río, M.A., Peña-Martínez, R., Villegas-Jiménez, N., Byerly-Murphy, K.F. y Rocha-Peña, M.A. (2001) Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35(4): 441-450.
- [20] Mendoza, A., Salazar, C., Alvarado, O., Cruz, M.A. and Becerra, H. (2003) Diferenciación molecular de razas severas y débiles de aislamientos del virus tristesas de los cítricos en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 26(4): 223-230.
- [21] Loeza-Kuk, E., Palacios-Torres, E.C., Ochoa-Martínez, D.L., Mora-Aguilera, G., Gutierrez-E., M.A., Febres, V.J., Moore, G.A. and Álvarez-Ramos, R. (2005) Molecular characterization of *Citrus tristeza virus* Isolates from Veracruz and Tamaulipas states,

Mexico. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010), 16(16): 4007-411. <https://doi.org/10.5070/C50682709x>

- [22] López-Arroyo, J.I., Loera-Gallardo, J., Rocha-Peña, M.A., Canales, R., Hernández, I., Reyes, M.A., Berlanga, A., y Miranda, M.A. (2008) Pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphidididae), pp. 279-292. Casos de control biológico en México. H.C. Arredondo y L.A. Rodríguez (eds.), Mundi-Prensa. México, D.F.
- [23] Müller, G.W., and Costa, A.S. (1987) Search for outstanding plants in tristeza infected citrus orchards: the best approach to control the disease by preimmunization. *Phytophylactica* 19:197-198
- [24] Ziebell, H., and Carr, J.P. (2010) Cross-protection: A century of mystery. *Advances in Virus Research* 76, 211–264. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(10\)76006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(10)76006-1)
- [25] Contreras-Maya, R. and Villegas-Monter, A. (2020) First report VT isolate of *Citrus tristeza virus* in Veracruz, Mexico. *Horticulture International Journal* 4(3): 75–76. <https://doi.org/10.15406/hij.2020.04.00161>
- [26] Kong, P., Rubio, L., Polek, M., and Falk, B.W. (2000) Population structure and genetic diversity within California *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. *Virus Genes* 21(3): 139-145. <https://doi.org/10.1023/a:1008198311398>
- [27] Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., and Dawson, W.O., (2004) Closterovirus bipolar virion: evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 50 region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(3): 799–804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307747100>
- [28] Satyanarayana, T., Gowda, S., Mawassi, M., Albiach-Marti, M.R., Aylion, 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(1): 253-265. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0638>
- [29] Bak, A. and Folimonova, S.Y. (2015) The conundrum of a unique protein encoded by citrus tristeza virus that is dispensable for infection of most hosts yet shows characteristics of a viral movement protein. *Virology* 485: 86–95. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.07.005>
- [30] Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O. and Ding, S.W. (2004) Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(44): 15742–15747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404940101>
- [31] Tatineni, S., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., and Dawson, W.O. (2008) Three genes of *Citrus tristeza virus* are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376(2): 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.038>



- [32] Tatineni, S., Robertson, C.J., Garnsey, S.M., and Dawson, W.O., (2011) A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(42): 17366-1737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113227108>
- [33] Rubio, L., Ayllón, M.A., Kong, P., Fernández, A., Polek, M.L., Guerri, J., Moreno, P. and Falk, B.W. (2001) Genetic variation of Citrus Tristeza Virus isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology* 75(17): 8054-8062. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8054-8062.2001>
- [34] Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M.E., Dawson, W.O., Galbraith, D.W., and Xiong, Z. (2007) Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS ONE* 2(9): e917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000917>
- [35] Iracheta, C.M.M., Arrieta, G.L.C. and Rocha, P.M.A. (2012) Detección del Virus Tristeza de los Cítricos mediante anticuerpos contra la proteína recombinante p25 de la cápside bajo un sistema de inmunopresión. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30 (1): 31–42.
- [36] 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(8): 909–917. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0909>
- [37] Harper, S.J., Dawson, T.E., and Pearson, M.N., (2010) Isolates of Citrus tristeza virus that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology* 155(4): 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0604-5>
- [38] Varveri, C., Olmos, A., Pina, J.A., Marroquín, C., and Cambra, M. (2015) Biological and molecular characterization of a distinct Citrus tristeza virus isolate originating from a lemon tree in Greece. *Plant Pathology* 64: 792–798. <https://doi.org/10.1111/ppa.12308>
- [39] Roy, A. and Brlansky, R.H. (2009) Population dynamics of a Florida Citrus tristeza virus isolate and aphid-transmitted subisolates: identification of three genotypic groups and recombinants after aphid transmission. *Phytopathology* 99(11): 1297–1306. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-11-1297>
- [40] Scott, K.A., Hlela, Q., Zablocki, O., Read, D., van Vuuren, S., and Pietersen, G., (2013) Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting Citrus tristeza virus strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted subisolates. *Archives of Virology* 158(1): 27–37. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1450-4>
- [41] Bergua, M., Phelan, D.M., Bak, A., Bloom, D.C., and Folimonova, S.Y. (2016) Simultaneous visualization of two Citrus tristeza virus genotypes provides new insights into the structure of multi-component virus populations in a host. *Virology* 491:10-19. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2016.01.017>

- [42] Lucas, W.J. (2006) Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344(1): 169–184. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.09.026>
- [43] Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., and Maule, A.J., (2010) Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23(11): 1403–1412. <http://doi.org/10.1094/MPMI-05-10-0116>
- [44] Schoelz, J.E., Harries, P.A., and Nelson, R.S. (2011) Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Molecular Plant* 4(5): 813–831. <http://doi.org/10.1093/mp/ssr070>
- [45] Harper, S.J., Killiny, N., Tatineni, S., Gowda, S., Cowell, S.J., Shilts, T., and Dawson, W.O. (2016) Sequence variation in two genes determines the efficacy of transmission of citrus tristeza virus by the brown citrus aphid. *Archives of Virology* 161, 3555–3559. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3070-x>
- [46] Yokomi, R.K., and DeBorde, R.L. (2005) Incidence, transmissibility, and genotype analysis of Citrus tristeza virus (CTV) isolates from CTV eradication and noneradication districts in central California. *Plant Disease* 89(8): 859-866. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0859>
- [47] Cambra, M., Gorrís, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., de Mendoza, A.H., López, A., and Navarro, L. (2000) Incidence and epidemiology of Citrus tristeza virus in the Valencian community of Spain. *Virus Research* 71(1-2): 85–95. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(00\)00190-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(00)00190-8)
- [48] Hernández-Rodríguez, L., Benítez-Galeano, M.J., Bertalmío, A., Rubio, L., Rivas, F., Arruabarrena, A., Rolón, R., Colina, R., and Maeso, D. (2019) Diversity of Uruguayan citrus tristeza virus populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology* 44: 352–362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>
- [49] Müller, G.W., Targon, M.L.P.N., Carvalho, S.A., Souza, A.A., and Rodrigues, J.C.V. (2005) Doenças de citros causadas por vírus e viróides. In: Mattos Junior, D.; De Negri, J.D.; Pio, R.M.; Pompeu Junior, J. *Citros*. Cordeirópolis: Instituto Agronômico; Fundag. pp: 567-604.
- [50] Burgyán, J., and Gáborjányi, R. (1984) Cross-protection and multiplication of mild and severe strains of TMV in tomato plants. *Journal of Phytopathology* 110(2): 156–167. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1984.tb03404.x>
- [51] Costa, A.S., and Müller, G.W. (1980) Tristeza control by cross protection: a US-Brazil cooperative success. *Plant Disease* 64(6): 538–41. <https://doi.org/10.1094/PD-64-538>
- [52] Ieki, H., Yamaguchi, A., Kano, T., Koizumi, M., and Iwanami, T. (1997) Control of stem pitting disease caused by citrus tristeza virus using protective mild strains in navel orange. *Japanese Journal of Phytopathology* 63:170–175. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.63.170>

- [53] Motoyoshi, F., and Nishiguchi, M. (1988) Control of virus diseases by attenuated virus strains, comparison between attenuated strains of cucumber green mottle mosaic virus and tobacco mosaic virus. *Gamma Field Symposia* 27: 91–109.
- [54] Kosaka, Y., and Fukunishi, T. (1993) Attenuated isolates of soybean mosaic virus derived at a low temperature. *Plant Disease* 77: 882–886. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0882>
- [55] Kosaka, Y., and Fukunishi, T. (1997) Multiple inoculation with three attenuated viruses for the control of cucumber virus disease. *Plant Disease* 81(7): 733–738. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.7.733>
- [56] Yang, G., Qiu, B.S., Liu, X.G., Li, Y., and Wang, X.F. (2002) Nonsense mutations of replicase and movement protein genes contribute to the attenuation of an avirulent tomato mosaic virus. *Virus Research* 87(2): 119–128. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(02\)00025-4](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(02)00025-4)
- [57] Kurihara, Y., and Watanabe, Y. (2003) Cross-protection in Arabidopsis against crucifer tobamovirus cg by an attenuated strain of the virus. *Molecular Plant Pathology* 4(4): 259–269. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00174.x>
- [58] Owor, B., Legg, J.P., Okao-Okuja, G., Obonyo, R., Kyamanywa, S., and Ogenga-Latigo, M.W. (2004) Field studies of cross protection with cassava mosaic geminiviruses in Uganda. *Journal of Phytopathology* 152(4): 243–249. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00837.x>
- [59] You, B.J., Chiang, C.H., Chen, L.F., Su, W.C., and Yeh, S.D. (2005) Engineered mild strains of Papaya ringspot virus for broader cross protection in cucurbits. *Phytopathology* 95(5): 533–540. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0533>
- [60] Yoon, J.Y., Ahn, H.I., Kim, M., Tsuda, S., and Ryu, K.H. (2006) Pepper mild mottle virus pathogenicity determinants and cross protection effect of attenuated mutants in pepper. *Virus Research* 118(1-2):23–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.11.004>
- [61] Kosaka, Y., Ryang, B.S., Kobori, T., Shiomi, H., Yasuhara, H., and Kataoka, M. (2006) Effectiveness of an attenuated Zucchini yellow mosaic virus isolate for Cross-Protecting cucumber. *Plant Disease* 90(1): 67–72. <https://doi.org/10.1094/PD-90-0067>
- [62] Lin, S.S., Wu, H.W., Jan, F.J., Hou, R.F., and Yeh, S.D. (2007) Modifications of the helper component-protease of Zucchini yellow mosaic virus for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology* 97(3): 287–296. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-3-0287>
- [63] Nakazono-Nagaoka, E., Takahashi, T., Shimizu, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Omura, T., and Sasaya, T. (2009) Cross-protection against Bean yellow mosaic virus (BYMV) and Clover yellow vein virus by attenuated BYMV isolate M11. *Phytopathology* 99(3): 251–257. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-3-0251>

- [64] Agüero, J., Gómez-Aix, C., Sempere, R.N., García-Villalba, J., García-Núñez, J., Hernando, Y., and Aranda, M.A. (2018) Stable and broad spectrum cross-protection against Pepino mosaic virus attained by mixed infection. *Frontiers in Plant Science* 9: 1810. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01810>
- [65] Da Graça, J.V., and van Vuuren, S.P. (2010) Managing Citrus tristeza virus losses using cross protection. In: *Citrus tristeza virus Complex and tristeza diseases*. Karasev A.V. and Hilf M.E. (eds.). American Phytopathological Society. St. Paul, MN, USA. pp: 247–260.
- [66] Roistacher, C., Da Graça, J.V., and Müller, G.W. (2010) Cross protection against *Citrus tristeza virus* a review. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 17: 1-27. <https://doi.org/10.5070/C573v0t59c>
- [67] Fu, Z. Q., and Dong X. (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64, 839-863. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105606>
- [68] Mandadi, K. K., and Scholthof, K.B. (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease?. *The Plant Cell* 25(5):1489-1505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
- [69] Wen, L. (2013) Cell Death in Plant Immune Response to Necrotrophs. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology* 1, 1-3. <https://doi.org/10.4172/jpbp.1000e103>
- [70] Pieterse, C. M. J., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., VanWees, S. C. M., Bakker, A. H. M. (2014) Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual Review of Phytopathology* 52, 347-375. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- [71] Alves, A.A., Guimarães, L.M.S., Chaves, A.R.M., DaMatta, F.M., and Alfenas, A.C. (2011) Leaf gas exchange and chlorophyll a fluorescence of *Eucalyptus urophylla* in response to *Puccinia psidii* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* 33:1831-1839. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0722-z>
- [72] Dallagnol, L.J., Rodrigues, F.A., Martins, S.C.V., Cavatte, P.C., and DaMatta, F.M. (2011) Alterations on rice leaf physiology during infection by *Bipolaris oryzae*. *Australian Plant Pathology* 40: 360-365. <https://doi.org/10.1007/s13313-011-0048-8>
- [73] Resende, R.S., Rodrigues, F.A., Cavatte, P.C., Martins, S.C.V., Moreira, W.R., Chaves, A.R., and DaMatta, F.M. (2012) Leaf gas exchange and oxidative stress in sorghum plants supplied with silicon and infected with *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 102(9): 892-898. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-12-0014-R>
- [74] Chaerle, L., and Van Der Straeten, D. (2001) Seeing is believing: imaging techniques to monitor plant health. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Structure and Expression* 1519(3): 153–166. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(01\)00238-X](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(01)00238-X)

- [75] Rolfe, S.A., and Scholes, J.D. (2010) Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions. *Protoplasma* 247(3-4): 163–175. <https://doi.org/10.1007/s00709-0100203-z>
- [76] Grimmer, M.K., Foulkes, M.J., and Paveley, N.D. (2012) Foliar pathogenesis and plant water relations: a review. *Journal of Experimental Botany* 63(12): 4321–4331. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers143>
- [77] Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., and Gleba, Y. (2004) In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101(18): 6852–6857. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400149101>
- [78] Bally, J., Nadai, M., Vitel, M., Rolland, A., Dumain, R., and Dubald, M. (2009) Plant physiological adaptations to the massive foreign protein synthesis occurring in recombinant chloroplasts. *Plant Physiology* 150(3): 1474–1481. <https://doi.org/10.1104/pp.109.139816>
- [79] Zeng, W.Q., Melotto, M., and He, S.Y. (2010) Plant stomata: a checkpoint of host immunity and pathogen virulence. *Curr. Opin. Biotechnol.* 21(5): 599–603. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.05.006>
- [80] McLachlan, D., Kopischke, M., and Robatzek, S. (2014) Gate control: guard cell regulation by microbial stress. *New Phytologist* 203(4): 1049–1063. <https://doi.org/10.1111/nph.12916>
- [81] Murray, R.R., Emblow, M.S.M., Hetherington, A.M., and Foster, G.D. (2016) Plant virus infections control stomatal development. *Scientific Reports* 6: 34507. <https://doi.org/10.1028/srep34507>
- [82] Sáenz, P.C.A., Osorio, H.E., Estrada, D.B., Poot, P.W.A, Delgado, M.R. and Rodríguez, H.R. (2019) Principales enfermedades en cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(7), 1653-1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.187>
- [83] Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllon, M.A., Albiach-Marti, M.R., Rabindram, R. and Dawson, W.O. (2002) The p23 protein of Citrus tristeza virus controls asymmetrical RNA accumulation. *J Virol.*76, 473–483.
- [84] Biswas, K.K., Palchoudhury, S., Sharma, S.K., Saha, B., Godara, S., Ghosh, D.K., Keremane, M.L. (2018) Analyses of 3' half genome of *citrus tristeza virus* reveal existence of distinct virus genotypes in citrus growing regions of India. *Virus Disease* 29(3): 308–315. <https://doi.org/10.1007/s13337-018-0456-2>
- [85] Roistacher, C.N., and Bar-Joseph, M. (1987) Aphid transmission of Citrus tristeza virus: a review. *Phytophylactica* 19, 163-167.



- [86] Çevik, B., Yard, N. and Korkmaz, S. (2013) The First Identified Citrus tristeza virus Isolate of Turkey Contains a Mixture of Mild and Severe Strains. *Plant Pathology* 29(1), 31-41. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2012.0141>
- [87] Gaona, G.G., Ruíz, C.E. and Peña, M.R. (2000) Los pulgones (Homoptera: Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranja, *Citrus sinensis* (L.), en la zona centro de Tamaulipas, México. *Acta zoológica mexicana* 81, 1-12.
- [88] Ochoa-Corona, F.M., Rocha-Peña, M.A. and Lee, F.R. (1995) Impacto del virus de la tristeza de los cítricos en la citricultura venezolana: cronología de eventos [The impact of Citrus tristeza virus on Venezuelan citriculture. Chronology of events]. *Revista Mexicana de Fitopatología* 12(1), 97-105.
- [89] Rivas-Valencia, P., Loeza-Kuk, E., Mora-Aguilera, G., Febres, V., Ochoa-Martínez, D.L., Gutiérrez-Espinosa, M.A., Jesus-Junior, W.C., Co-rreia-Malvas, C. and Arno-Wulff, N. (2008) Estructura poblacional de aislamientos del Citrus tristeza virus y su asociación con la muerte súbita de los cítricos en Brasil [Population structure of Citrus tristeza virus isolates and its association with citrus sudden death in Brazil]. *Agrociencia* 42, 85-93
- [90] Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Chiumenti, M., Saponari, M., Gilampetruzzi, A., Weng, Z., Xiong, Z., and Hajeri S. (2018) Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. *Archives of Virology* 163, 1795–1804. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3799-5>
- [91] Becerra, L.E.N. (1996) Virus de la tristeza de los cítricos 2a edición. Campo experimental Cotaxtla CIRGC. INIFAP. SARH.
- [92] Knorr, L.C., DuCharme, E. P. (1951) This is tristeza - Ravager of Argentina's citrus industry. *Citrus Magazine* 13, 17-19.
- [93] Michaud, J.P., and Alvarez, R. (2000) The first collection of brown citrus aphids (Homoptera: Aphididae) is in Quintana Roo, Mexico. *Florida Entomologist* 83(3), 357-358. <https://doi.org/10.2307/3496356>
- [94] Leonel, W.M.S., Corazza, M.J., Zanutto, C.A., Müller, G.W., Carvalho, S.A. and Nunes, W.M.C. (2015) Stability of Citrus tristeza virus protective isolates 'Pêra IAC' according to SSCP analysis of old and new lines of three sweet orange varieties. *Summa Phytopathologica* 41(1), 8-12. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1991>
- [95] Roistacher, C.N. (2005) Indexing for viruses in citrus. In: Hadidi, Khetarpal, Koganezawa (Eds.), *Plant Virus Disease Control*. APS Press, St. Paul, MN, pp. 301-319.
- [96] Matos, L.A., Hilf, M.E., Cayetano, X.A., Feliz, A.O., Harper, S.J. and Folimonova, S.Y. (2013) Dramatic change in Citrus tristeza virus populations in the Dominican Republic. *Plant Disease* 97(3), 339-345. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0421-RE>

- [97] Campolo, O., Chiera E., Malacrino, A., Laudani, F., Fontana, A., Albanese, G.R. and Palmeri, V. (2014) Acquisition and transmission of selected CTV isolate by *Aphis gossypii*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17, 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.04.008>
- [98] Wu, F., Huang, M., Fox, E.G.P., Huang, J., Cen, Y., Deng, X. and Xu, M. (2021) Preliminary Report on the Acquisition, Persistence, and Potential Transmission of Citrus tristeza virus by *Diaphorina citri*. *Insects* 12(735), 1-15. <https://doi.org/10.3390/insects12080735>
- [99] Wang, J., Bozan, O., Kwon, S.J., Dang, T., Rucker, T., Yokomi, R. K., Lee, R. F., Folimonova, S. Y., Krueger, R. R., Bash, J., Greer, G., Diaz, J., Serna, R. and Vidalakis, G. (2013) Past and future of a century-old Citrus tristeza virus collection: a California citrus germplasm tale. *Frontiers in Microbiology* 4(366), 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00366>
- [100] Díaz-Padilla, G., López-Arroyo, J.I., Sánchez-Cohen I., Guajardo-Panes R.A., Mora-Aguilera G., Quijano-Carranza J. Á. (2014) Áreas de abundancia potencial en México del vector del Huanglongbing, *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 5 (7), 1137-1153.
- [101] Besoain, X., Bertolini, E., Camps, R., Ramella, F., Gorris, M. T., Torres, M., and Cambra, M. (2015) Aggressive Citrus tristeza virus isolates in Chile are MCA13-positive and VT type, while mild isolates are MCA13-negative and T30 type. *Ciencia e Investigación Agraria*. 42(2), 251-262. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000200011>
- [102] Davino, S., Davino, M., Sambade, A., Guardo. M. and Caruso, A. (2003) The first Citrus tristeza virus outbreak was found in a relevant citrus-producing area of Sicily, Italy. *Plant Disease* 87(3): 314. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.314A>
- [103] Bar-Joseph, M. and Dawson, W.O. (2008) Citrus tristeza virus. In: Mahy BWJ and Van Regenmortel MHV (eds.). *Encyclopedia of Virology*. Elsevier Ltd., Amsterdam. pp. 520–525.
- [104] Read, D.A., Palacios, M.F., Figueroa, J., Foguet L., Kleynhans ,J., Stein B. and Pietersen, G. (2017) Survey of citrus tristeza virus (CTV) strains in Citrus x limon (L) Burm f. (lemon) in Tucumán Province, Argentina. *European Journal Plant Pathology* 149, 1029-1039. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1245-2>
- [105] Dawson, W.O., Garnsey, S.M., Tatineni, S., Folimonova, S.Y., Harper, S.J. and Gowda, S. (2013) Citrus tristeza virus-host interactions. *Frontiers in Microbiology* 4, 88. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00088>
- [106] Abbas, M., Khan, M.M., Mughal, S.M., Ji, P. (2015) Comparison of infection of Citrus tristeza closterovirus in Kinnow mandarin (*Citrus reticulata*) and Mosambi sweet orange (*Citrus sinensis*) in Pakistan. *Crop Protection* 78, 146-150. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.09.006>

- [107] Tenorio, C.A., de Carvalho, N.W.M., Zanutto, C.A. and Müller, G.W. (2010) Stability of Citrus tristeza virus protective isolates in field conditions. *Pesquisa agropecuária Brasil*, Brasília 45(7), 693-700. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010000700009>
- [108] Maloy, O.C. (2005) *Plant Disease Management. The Plant Health Instructor*. American Phytopathology Society. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2005-0202-01>
- [109] Castle, W.S. (2010) A career perspective on citrus rootstocks, their development, and commercialization. *HortScience* 45(1): 11–15. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.45.1.11>
- [110] Coffey, M.D. and Guillemet, F. (1987) Avocado Rootstocks. *California Avocado Society Yearbook* 71: 173-179.
- [111] Bitters, W.T. (1972) Reaction of some new citrus hybrids and citrus introductions as rootstocks to inoculations with tristeza virus in California. *Proceedings of the 5th Conference of International Organization of Citrus Virologists*, Universidad de Florida, Gainesville, Florida. pp. 12-20.
- [112] Bowman, K.D. and Joubert, J. (2020) Citrus rootstocks. In: *The Genus Citrus*. M. Talon, M. Caruso, and F. G. Gmitter (eds.) Elsevier. Cambridge, UK, pp: 105–127. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00006-1>
- [113] Bowman, K.D., McCollum, G. and Albrecht, U. (2021) SuperSour: a new strategy for breeding superior Citrus rootstocks. *Frontiers in Plant Science* 12: 741009. <http://doi.org/10.3389/fpls.2021.741009>
- [114] Van Vuuren, S.P., Collins, R.P. and da Graça, J.V. (1993) Evaluation of citrus tristeza virus isolates for cross protection of grapefruit in South Africa. *Plant Disease* 77(1): 24–28. <https://doi.org/10.1094/PD-77-0024>
- [115] Folimonova, S.Y. (2012) Superinfection exclusion is an active virus–controlled function that requires a specific viral protection. *Journal of Virology* 86, 5554–5561. <https://doi.org/10.1128/JVI.00310-12>
- [116] Atallah, O.O.; Kang, S.-H.; El-Mohtar, C.A.; Shilts, T.; Bergua, M.; Folimonova, S.Y. (2016) A 5′-proximal region of the Citrus tristeza virus genome encoding two leader proteases is involved in virus superinfection exclusion. *Virology* 489, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.12.008>
- [117] Folimonova, S.Y., Achor D. and Bar-Joseph M. (2020) Walking Together: Cross-Protection, Genome Conservation, and the Replication Machinery of Citrus tristeza virus. *Viruses*, 12, 1353. <https://doi.org/10.3390/v12121353>
- [118] Cong, Q.Q., Wang, Y., Liu, J., Lan, Y.F., Guo, Z.K., Yang, J. G., Li, X.D. and Tian, Y.P. (2019) Evaluation of Potato virus X mild mutants for cross protection against severe infection in China. *Virology Journal* 16(36): 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1143-7>



- [119] Karasev, AV. (2000) Genetic diversity and evolution of Closteroviruses. Annual Review Phytopathology 38: 293-324. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.293>
- [120] Bar-Joseph, M., Marcus, R. and Lee, R. F. (1989) The continuous challenge of citrus tristeza virus control. Annual Review of Phytopathology 27: 291–316. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001451>
- [121] Román, M.P., Cambra, M., Juárez, J., Moreno, P., Duran-Vila, N., Tanaka, F.A.O., Alves, E., Kitajima, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Jesus Junior, W.C., Ayres, A.J., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F. and Bové, J.M. (2004) Sudden death of citrus in Brazil: a graft-transmissible bud union disease. Plant Disease 88(5): 453-467. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.5.453>
- [122] Bettiol, W. (1996) Biological control of plant pathogens in Brazil: application and current research. World Journal of Microbiology and Biotechnology 12(5): 505-510. 12(5):505-10. <https://doi.org/10.1007/BF00419464>
- [123] Lin, C.Y., Wu, M.L., Shen, T.L., Yeh, H.H., and Hung, T.H. (2015) Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and Citrus exocortis viroid infecting citrus in Taiwan. Virology Journal 12(11): 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0247-y>
- [124] Serra, P., Barbosa, C.J., Daròs, J.A., Flores, R. and Duran-Vila, N. (2008) Citrus viroid V: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus Apscaviroid. Virology 370(1): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.07.033>
- [125] Saponari, M., Loconsole, G., Liao, H.H., Jiang, B., Savino, V. and Yokomi, R.K. (2013) Validation of high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. Journal of Virological Methods 193(2): 478-486. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.002>
- [126] Roy, A., Fayad, A., Barthe, G. and Brlansky, R.H. (2005) A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. Journal of Virological Methods 129(1): 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.05.008>
- [127] Berg, A., Pietschmann, T., Rethwilm, A., Lindemann, D. (2003) Determinants of foamy virus envelope glycoprotein mediated resistance to superinfection. Virology 314, 243–252. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00401-x](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00401-x)
- [128] Lee, Y.M., Tscherne, D.M., Yun, S.I., Frolov, I., Rice, C.M. (2005) Dual mechanisms of pestiviral superinfection exclusion at entry and RNA replication. Journal of Virology 79, 3231–3242. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.6.3231-3242.2005>
- [129] Laliberte, J.P., Moss, B. (2014) A novel mode of poxvirus superinfection exclusion that prevents fusion of the lipid bilayers of viral and cellular membranes. Journal of Virology 88, 9751–9768. <https://doi.org/10.1128/JVI.00816-14>

- [130] Licciardello, G., Xiao, C., Russo, M., Dai, S.M., Daden, M., Deng, Z.N. and Catara, A.F. (2015) Genetic structure of citrus tristeza virus in Hunan province (PR China). *Acta Horticulturae* 1065: 781–790. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2015.1065.98>
- [131] Folimonova, S.Y., Robertson, C.J., Shilts, T., Folimonov, A.S., Hilf, M.E., Garnsey, S.M. and Dawson, W.O. (2010) Infection with strains of Citrus Tristeza virus does not exclude superinfection by other strains of the virus. *Journal of Virology* 84(3): 1314–1325. <https://doi.org/10.1128/JVI.02075-09>
- [132] Folimonova, S.Y. (2013) Developing an understanding of cross-protection by Citrus tristeza virus. *Frontiers in Microbiology* 4(76): 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00076>
- [133] Vu, T.X., Ngo, T.T., Mai, L.T.D., Bui, T.T., Le, D.H., Bui, H.T.V. and Tran, V.T. (2018) A highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation system for the postharvest pathogen *Penicillium digitatum* using DsRed and GFP to visualize citrus host colonization. *Journal of Microbiological Methods* 144(1): 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2017.11.019>
- [134] FAO. (2020) Citrus fruit - fresh and processed statistical bulletin 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT statistical database. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- [135] SIAP. (2019) Anuario Estadístico de Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- [136] Catara, A.F., Bar-Joseph, M. and Licciardello, G. (2015) *Citrus tristeza virus* methods and protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2015. Humana Press. New York. USA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5>
- [137] Moreno, P. and Garnsey, S.M. (2010) Citrus tristeza diseases- A worldwide perspective. In: Karasev AV, Hilf ME (eds) *Citrus tristeza virus* complex and tristeza diseases. APS Press, St. Paul, MN, pp 27–49.
- [138] Leonel, W.M.S., Corazza, M.J., Zanutto, C.A., Müller, G.W., Carvalho, S.A. and Nunes, W.M.C. (2015) Stability of *Citrus tristeza virus* protective isolate 'Pêra IAC' according to SSCP analysis of old and new lines of three sweet orange varieties. *Summa Phytopathologica* 41(1); 8-12. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/1991>
- [139] Garnsey, S., Civerolo, L., Gumpf, J., Paul, C., Hilf, E., Lee, R., Brlansky, R., Yokomi, K. and Hartung, S. (2005) Biological characterization of an International Collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In: M. E. Hilf, N. Duran-Vila, M.A.Rocha-Peña (eds.). *Proceedings of the 16th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside, CA.* 75-93.
- [140] Zanutto, C.A., Corazza, M.J., Nunes, W.M.C. and Müller, G.W. (2013) Evaluation of the capacity of new mild *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates selected for a preimmunization program. *Scientia Agricola, Piracicaba* 70(2): 116-124. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162013000200009>

- [141] Shu, X., Yin, L., Zhang, Q. and Wang, W. (2012) Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. *Environmental Science Pollution Research* 19: 893–902. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0625-y>
- [142] Küpper, H., Šetlík, I., Setlikova, E., Ferimazova, N., Spiller, M. and Küpper, F.C. (2003) Copper-induced inhibition of photosynthesis: Limiting steps of in vivo copper chlorophyll formation in *Scmedesmus quadricanda*. *Functional Plant Biology* 30: 1187–1190.
- [143] Arora, A., Sairam, R.K. and Sriuastava, G.C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82, 1227–1238
- [144] Hančević, K., Radić, T., Pasković, I. and Urlić, B. (2018) Biochemical and physiological responses to long-term *Citrus tristeza virus* infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology* 67: 987–994. <https://doi.org/10.1111/ppa.12799>
- [145] Padoan, D., Mossad, A., Chiancone, B., Germana, M.A. and Valli, K.P.S.S. (2013) Ploidy levels in *Citrus clementine* affects leaf morphology, stomatal density and water content. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* 25(4): 283-290. <https://doi.org/10.1590/S2197-00252013000400006>
- [146] Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S.Y. (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969–980
- [147] Soler, N., Fagoaga, C., López, C., Moreno, P., Navarro, L., Flores, R. and Peña, L. (2015) Symptoms induced by transgenic expression of p23 from *Citrus tristeza virus* in phloem-associated cells of Mexican lime mimic virus infection without the aberrations accompanying constitutive expression. *Molecular Plant Pathology* 16: 388–399. <https://doi.org/10.1111/mpp.12188>
- [148] Gómez-Muñoz, N., Velázquez, K., Vives, M.C., Ruiz-Ruiz, S., Pina, J.A., Flores, R. Moreno, P., and Guerri, J. (2017) The resistance of sour orange to *Citrus tristeza virus* is mediated by both the salicylic acid and RNA silencing defence pathways. *Molecular Plant Pathology* 18(9): 1253-1266. <https://doi.org/10.1111/mpp.12488>
- [149] Atta, S., Cao, M., Umar, U., Zhou, Y., Yang, F. and Zhou, C. (2017) Biological indexing and genetic analysis of *Citrus tristeza virus* in Pakistan. *Journal of General Plant Pathology* 83, 382–389. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0737-4>
- [150] Samaniego-Gámez, B.Y., Garruña, R., Tun-Suárez, J.M., Moreno-Valenzuela, O.A., Reyes-Ramírez, A., Valle-Gough, R.E., Ail-Catzim, C.E. and Toscano-Palomar, L. (2021) Healthy photosynthetic mechanism suggests ISR elicited by *Bacillus* spp. in *Capsicum chinense* Plants Infected with PepGMV. *Pathogens* 10, 455. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040455>
- [151] Tarafdar, A., Godara, S., Dwivedi, S., Jayakumar, B.K. and Biswas, K.K. (2013) Characterization of *Citrus tristeza virus* and determination of genetic variability in North-east and South India. *Indian Phytopathology* 66 (3): 302–307.

- [152] Møller, I.M., Jensen, P.E. and Hansson, A. (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology* 58: 459–481. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103946>
- [153] Olarte-Ortíz, O., Almaguer-Vargas, G. y Espinoza, E.J.R. (2001) Efecto de la fertilización foliar en el estado nutrimental, la fotosíntesis, la concentración de carbohidratos y el rendimiento en naranja ‘Valencia Late’. *Terra Latinoamericana* 18(4): 339-347.
- [154] Ribeiro, R.V., Machado, E.C. and Oliveira, R.F. (2003) Early photosynthetic responses of sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 167–173. [https://doi.org/10.1016/S0885-5765\(03\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00038-9)
- [155] Medrano, H., Escalona, J.M., Bota, J., Gulías, J. and Flexas, J. (2002) Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany*, 89: 895-905. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf079>
- [156] Chaves, M.M., Zarrouk, O., Francisco, R., Costa, J.M., Santos, T., Regalado, A.P., Rodrigues, M.L. and Lopes, C.M. (2010) Grapevine under deficit irrigation: hints from physiological and molecular data. *Annals of Botany*, 105: 661-676. <https://doi.org/10.1093/aob/mcq030>
- [157] Prieto, J.A., Lebon, E. and Ojeda, H. (2010) Stomatal behaviour of different grapevine cultivars in response to soil water status and air water vapour pressure deficit. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 44(1): 9-20. <https://doi.org/10.2087/oenone.2010.44.1.1459>
- [158] Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Gonçalves, B., Bacelar, E., Coutinho, J., Ferreira, H., Louzada, J.L. and Cortez, I. (2012) Impacts of leafroll-associated viruses (GLRaV-1 and-3) on the physiology of the Portuguese grapevine cultivar ‘Touriga Nacional’ growing under field conditions. *Annals of Applied Biology* 160 (3): 237–249. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00536.x>
- [159] Souza, P.F.N., Silva, F.D.A., Carvalho, F.E.L., Silveira, J.A.G., Vasconcelos, I.M. and Oliveira, J.T.A. (2017) Photosynthetic and biochemical mechanisms of an EMS-mutagenized cowpea associated with its resistance to cowpea severe mosaic virus. *Plant Cell Reports* 36(1): 219–234. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2074-z>
- [160] Orsini, F., Alnayef, M., Bona, S., Maggio, A. and Gianquinto, G. (2012) Low stomatal density and reduced transpiration facilitate strawberry adaptation to salinity. *Environmental and Experimental Botany* 81: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.005>
- [161] Tatineni, S. and Dowson, W.O. (2012) Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virology* 86: 7850–7857. <https://doi.org/10.1128/JVI.00916-12>

- [162] De Schepper, V., De Swaef, T., Bauweraerts, I. and Steppe, K. (2013) Phloem transport: a review of mechanisms and controls. *Journal of Experimental Botany* 64(16): 4839–4850. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert302>
- [163] Sperry, J.S., Venturas, M.D., Anderegg, W.R.L., Mencuccini, M., Mackay, D.S., Wang, Y. and Love, D.M. (2017) Predicting stomatal responses to the environment from the optimization of photosynthetic gain and hydraulic cost. *Plant, Cell & Environment* 40(6): 816–830. <https://doi.org/10.1111/pce.12852>
- [164] Navarro, J.M., Pérez-Pérez, J.G., Romero, P., and Botía, P. (2010) Analysis of the changes in quality in mandarin fruit, produced by deficit irrigation treatments. *Food Chemistry* 119: 1591-1596. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.048>
- [165] Perez-Clemente, R., Montoliu, A., Vives-Peris, V., Climent, M.F. and Gómez-Cadenas, A. (2014) Photosynthetic and antioxidant responses of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* [Christm.] Swing) plants to Citrus Tristeza Virus infection. *Plant Pathology* 64: 16-24. <https://doi.org/10.1111/ppa.12241>
- [166] Reyes-López, D., Quiroz-Valentín, J., Kelso-Bucio, H.A., Huerta-Lara, M., Avendaño-Arrazate, C.H., and Lobato-Ortiz, R. (2015) Stomatal characterization of five species of genus *Vanilla*. *Agronomía Mesoamericana*, 26(2): 237-246. <https://doi.org/10.15517/am.v26i2.19279>
- [167] Berdeja-Arbeu, R., Villegas-Monter, A., Ruíz-Posadas, L.M., Sahagún-Castellanos, J. y Colinas-León, M.T. (2010) Interacción lima persa-portainjertos. Efecto en características estomáticas de hoja y vigor de árboles. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 16(9): 1-97.
- [168] Arrieta-Ramos, B. G., Villegas-Monter, A., Hernández-Bautisa, A., Rodríguez-Mendoza, M.N., Ruiz-Posadas, L.M. y García-Villanueva, E. (2010) Estomas y vigor de naranjo 'Valencia' injertado en portainjertos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(3): 257-263. <https://doi.org/10.35196/rfm.1010.3.257>
- [169] Franks, P.J., Doheny-Adams, T.W., Britton-Harper, Z.J. and Gray, J.E. (2015) Increasing water-use efficiency directly through genetic manipulation of stomatal density. *The New Phytologist* 207(1): 188–195. <https://doi.org/10.1111/nph.13347>
- [170] Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y. and Liu, Y. (2016) Chloroplast in plant-virus interaction. *Frontiers in Microbiology* 7: 1565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01565>
- [171] Moreira, S. 1960. Um novo problema para nossa citricultura. *Revista de Agricultura (Piracicaba)* 35: 77-82.
- [172] Salibe, A.A., Tubelis, A., Crocomo, O.J., Gallo, L.A., and Oliveira, E.T. (1992) The Citrovida clone: a plant matrix of citrus. *Laranja* 13: 261–273.

- [173] Müller, G.W., Targon, M.L.P.N., and Machado, M.A. (1999) Thirty years of preimmunized “Pêra IAC” sweet orange in the citriculture of São Paulo state, Brazil. *Laranja* 20: 399–408.
- [174] Rahoutei, J., García-Luque, I., and Barón, M. (2000) Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum* 110(2): 286–292. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110220.x>
- [175] Christov, I., Stefanov, D., Velinov, T., Goltsev, V., Georgieva, K., Abracheva, P., Genova, Y., and Christov, N. (2007) The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology* 164(9): 1124-1133. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.11.016>
- [176] Kyseláková, H., Prokopová, J., Nauš, J., Novák, O., Navrátil, M., Safářová, D., Spundová, M., and Ilík, P. (2011) Photosynthetic alterations of pea leaves infected systemically by pea enation mosaic virus: A coordinated decrease in efficiencies of CO<sub>2</sub> assimilation and photosystem II photochemistry. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(11): 1279-89. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.08.006>
- [177] Manfre, A., Glenn, M., Nuñez, A., Moreau, R.A., and Dardick C. (2011) Light quantity and photosystem function mediate host susceptibility to Turnip mosaic virus via a salicylic acid-independent mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(3): 315–327. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-10-0191>
- [178] Muir, C.D. (2020) A stomatal model of anatomical tradeoffs between gas exchange and pathogen colonization. *Frontiers in Plant Science* 11: 518991. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.518991>