



Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria  
U R U G U A Y

# Caracterización del genotipo RB (resistance breaking) de citrus tristeza virus y su efecto sobre *Poncirus trifoliata*

Ing. Agr. Leticia Rubio

Doctorado en Ciencias Agrarias  
Facultad de Agronomía  
Universidad de la República  
2018-2021

Tutor: PhD. Ing. Agr. Fernando Rivas  
Co-tutor: PhD. Lic. Rodney Colina  
Mentor: Msc. Ing. Agr. Diego Maeso

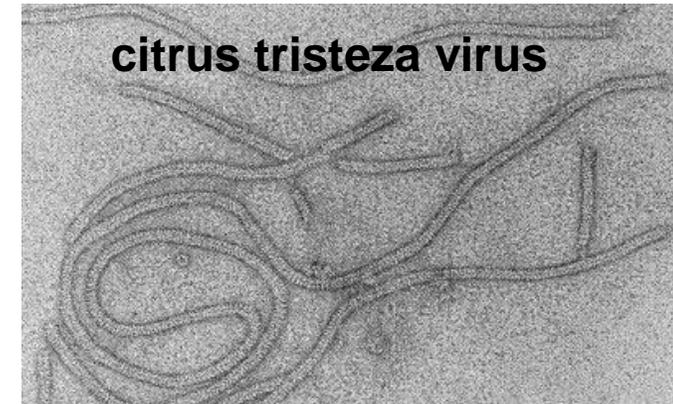


Proyecto INIA marco: Contribuciones para mejorar la  
calidad sanitaria y la inocuidad de la fruta cítrica.

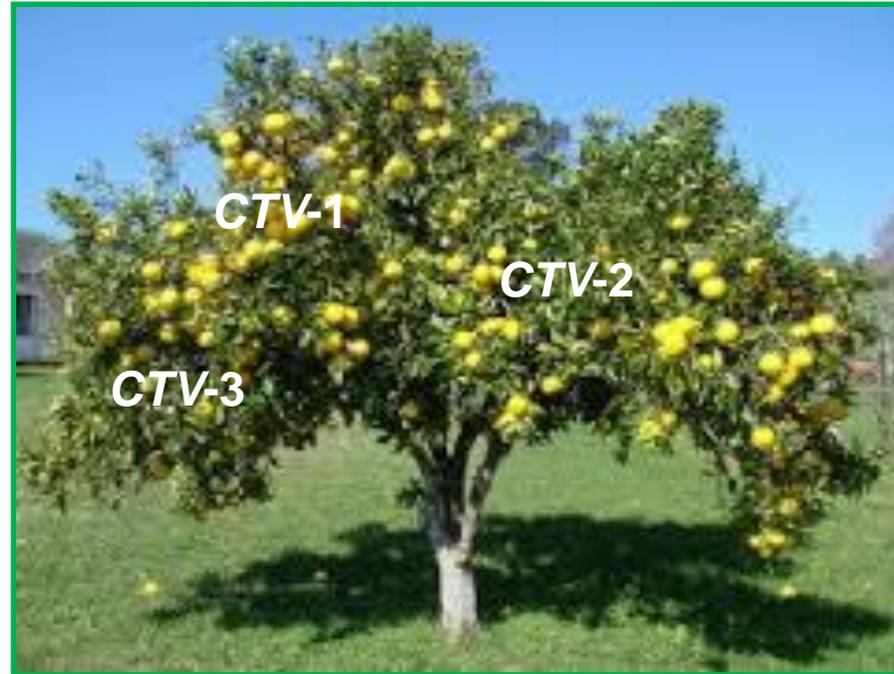
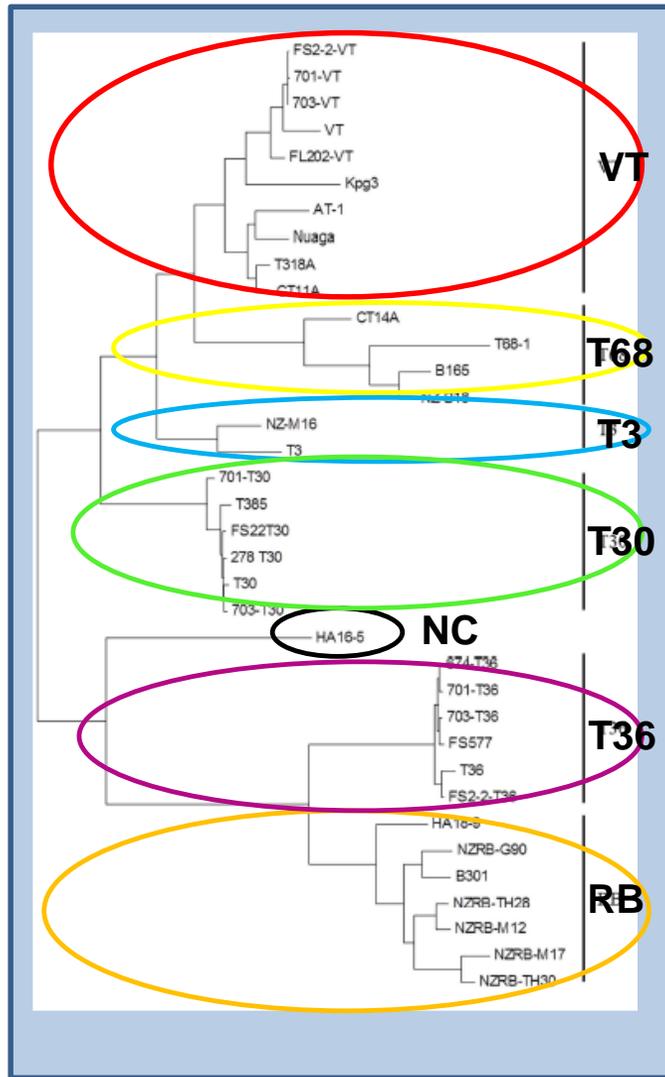
ANII-FMV. Caracterización del comportamiento del genotipo RB  
de y su efecto sobre los principales portainjertos de cítricos de  
Uruguay.

# La tristeza de los cítricos

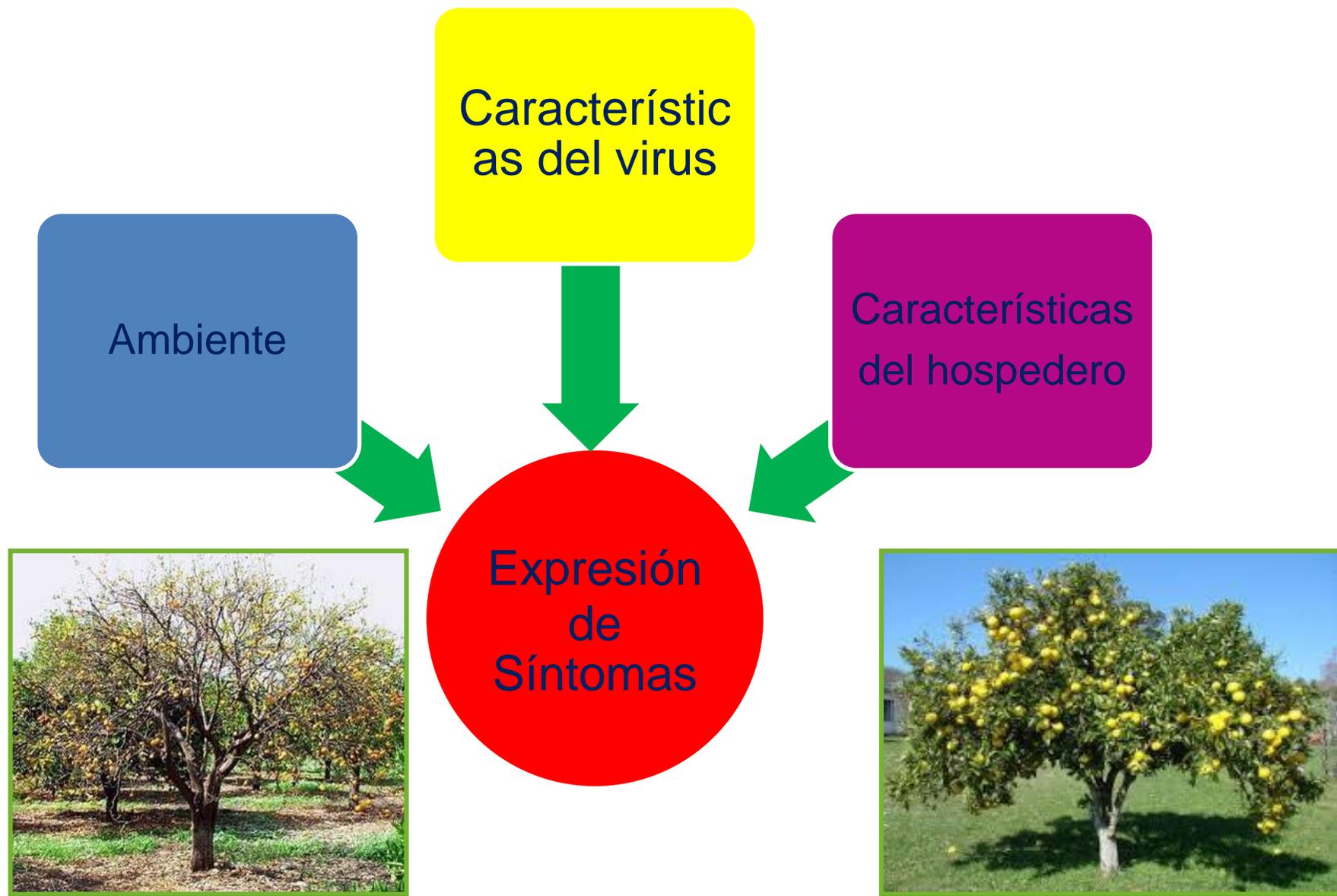
- ❖ Agente etiológico es citrus tristeza virus (CTV).
- ❖ Restringido a floema de especies e híbridos de los géneros Citrus y Fortunella.
- ❖ Transmisible por pulgones e injerto.

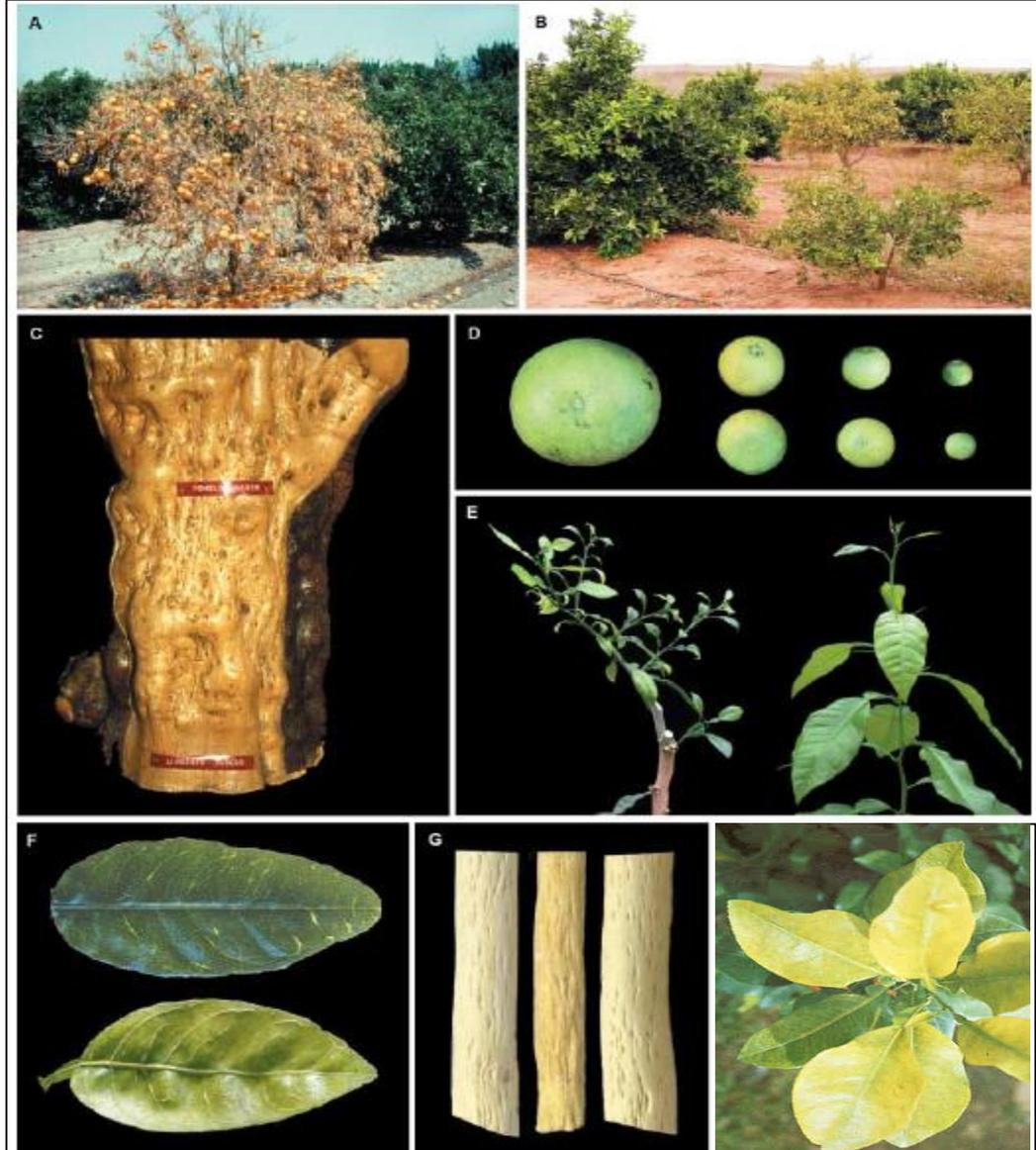


## Clasificación genética de CTV (Harper, 2013)



Genotipo ↔ Fenotipo





## SÍNTOMAS DE TRISTEZA, SP Y SY

- A) Tristeza. Síndrome de declinamiento rápido.
- B) Árboles en diferentes estados de declinamiento.
- C) SP severo en el tronco de un pomelo injertado en *P. trifoliata*.
- D) Frutos de pomelo afectados por SP severo.
- E) SY: crecimiento atrofiado, hojas pequeñas y amarillentas (izquierda) y planta inoculada con aislado suave de CTV (derecha).
- F) Aclaramiento de nervaduras (arriba) y acorchamiento de nervaduras (abajo).
- G) A canaladuras en la madera.

Moreno *et al.*, 2008

# Manejo de la enfermedad

## Declinamiento



**Portainjertos resistentes**

***Poncirus trifoliata***

## Acanaladuras



**Protección cruzada**

**Resistencia genética**

Aún así.....

- ✓ Se ha observado pérdidas de productividad en pomelos y variedades de naranjo dulce, injertados en portainjertos resistentes (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Cambra y Moreno, 2000).

Reducción del tamaño de los frutos por CTV



Fuente: Roistacher, Ch.



Fuente: Navarro, L.



Fuente: Maeso, et al.

- ✓ Hay reportes de cepas de CTV que quiebran la resistencia de *P. trifoliata* (Dawson y Mooney, 2000; Harper, et al., 2010 ;Yokomi, et al., 2017).

## CTV: situación en Uruguay

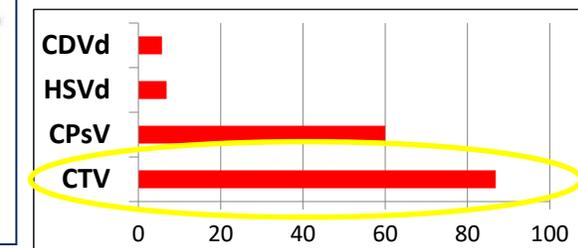
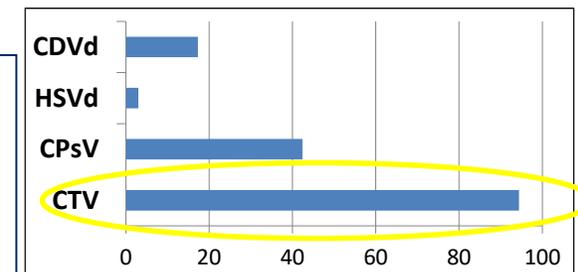
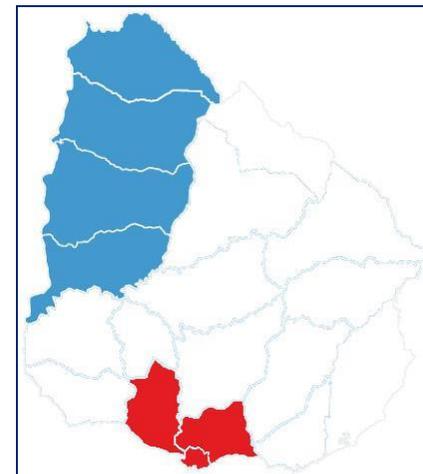
- ❖ **Enfermedad endémica y presencia de su vector más eficiente *Toxoptera citricida*** (Bentancour et.al.,2009).
- ❖ Manejo: uso de **portainjerto resistente: *P. trifoliata***.
- ❖ **Más del 90% de las plantas muestreadas en campo tienen CTV,**  
**predominan aislados severos y existe alta variabilidad genética del virus**  
(Rubio *et al.*, 2018, Benítez-Galeano, et al., 2017).

- ❖ **Reporte del genotipo RB** (Hernández- Rodríguez, et al. 2018)



**“Resistance Breaking a *P. trifoliata*”**

único genotipo de CTV hasta el momento que puede replicarse e infectar sistémicamente a *P. trifoliata*



## ***El genotipo RB-CTV: “Resistance Breaking a P. trifoliata”***

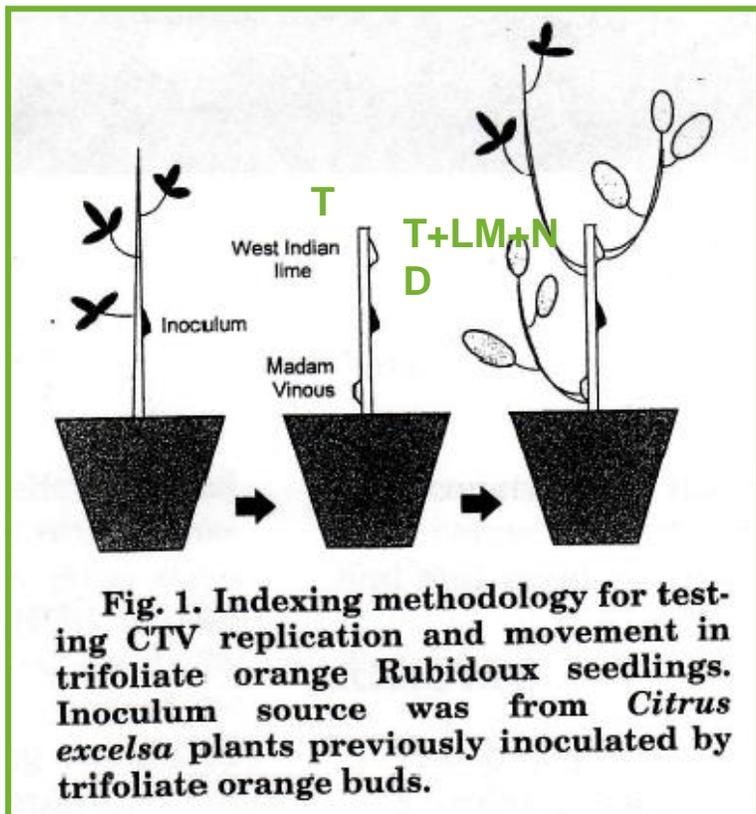
*Fourteenth IOCV Conference, 2000—Citrus Tristeza Virus*

### **Evidence for Trifoliolate Resistance Breaking Isolates of Citrus Tristeza Virus in New Zealand**

**T. E. Dawson and P. A. Mooney**

#### **Premisas sobre CTV- *P. Trifoliata*:**

- ❖ ***P. trifoliata* tiene genes RR a CTV**
- ❖ **CTV no se replica**, se acumula en el sitio de inoculación o se mueve a cortas distancias.



❖ Se comprobó que *RB se replica y trasloca* en plantines de *Rubidoux*

❖ *RB se mueve activamente en trifolia*

Isolate	Biological characteristics					
	Quick decline	Seedling yellows	Stunting	Stem pitting		
		EL <sup>z</sup>	DG <sup>y</sup>	MV <sup>x</sup>	DG	ML <sup>w</sup>
NS2	— <sup>v</sup>	—	—	—	—	—
NS9	—	—	—	Mild	Moderate	Severe
NS11	+	Severe	Moderate	Moderate	Mild	Severe
NS13	+	Mild	Severe	Mild	—	Severe
NS16	—	—	—	Mild	Mild	Moderate
NS19	+	Severe	Severe	Severe	—	Moderate
NS21	+	Severe	Severe	Moderate	—	Moderate
NS23	+	Severe	Mild	Severe	Mild	Severe
NS24	+	Mild	Moderate	—	—	Moderate
NS25	+	Severe	Severe	Mild	—	Severe
NS27	—	—	—	—	Mild	Moderate
NS29	+	Severe	Severe	Severe	Mild	Severe
NS34	—	—	—	—	—	Severe
NS36	+	Moderate	Severe	—	—	Severe
NS43	nd	nd	nd	nd	nd	nd

❖ En indicadoras: síntomas DI, SY y SP suaves a severos

Dawson y Money, 2000

## Reportes del genotipo RB:

- ❖ 2010- 5 aislados nuevos en N. Zelanda (Harper et al.)
- ❖ 2010- Hawaii (Melzer et al.)
- ❖ 2013- Puerto Rico (Roy et al.)
- ❖ 2013- República Dominicana ( Mattos et al.)
- ❖ 2013- Sudáfrica (Scott et al.)
- ❖ 2017- California (Yokomi et al.)
- ❖ 2017- Uruguay (Hernández et al.)
- ❖ 2018- China (Wang et al., 2018)



### En California (Yokomi et al., 2017):

- Se encontró aislados RB en bancos de una colección desde 1960
- Confirmaron infección en *P. trifoliata* y pasaje de este a ND.
- Lograron transmitirlo por injerto y por áfidos.
- Generó síntomas suaves en las indicadoras

# RB en Uruguay

- Se encontró aislados con secuencias RB en una colección de más de 15 años (Rubio, 2016).
- Se encontró aislados RB en muestras de campo colectadas durante 2014 y 2015
- Aparece en infecciones mixtas con otros genotipos (Rubio, et al. 2018; Benitez Galeano, et al., 2019).
- Se obtuvo un aislado RB “puro” por SAT (Hernández-Rodríguez, et al., 2019).
- Se logró transmitirlo por injerto y pulgón (Hernández-Rodríguez, et al., 2019; 2018).

June 2017, Volume 101, Number 6  
Page 1063  
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0430-PDN>

## DISEASE NOTES

### First Report of the *Citrus tristeza virus* Trifoliolate Resistance-Breaking (RB) Genotype in 'Newhall' Sweet Orange in South America

L. Hernández-Rodríguez, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Playa, Havana City, Cuba; A. Bertalmío, A. Arruabarrena, L. Rubio, and F. Rivas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, CP50000, Salto, Uruguay; and M. J. Benítez-Galeano and R. Colina, Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, Rivera 1350, CP50000 Salto, Uruguay; and D. Maeso, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental INIA Las Brujas, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay.



## ***La variante RB: “resistance breaking”: implicancias...***

- ❖ **Produce infección sistémica en portainjertos trifoliados**
- ❖ ***P. Trifoliata* es el principal portainjerto en Uruguay**
- ❖ **No hay reportes de muerte de plantas en campo**
- ❖ **No se ha cuantificado el efecto sobre parámetros fisiológicos**
- ❖ **Circula desde hace años en varias regiones citrícolas**
- ❖ **Su incidencia es baja, puede estar subestimada**
- ❖ **Hay aislados con diferentes características**

## Objetivo general

Caracterizar el genotipo RB local de citrus tristeza virus y evaluar su efecto sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos de de *P. trifoliata* y plantines de cítricos (naranja W. Navel/*P. trifoliata*).

## Objetivos específicos:

1

- Determinar la reacción de RB en indicadoras

2

- Evaluar la eficiencia de transmisión por pulgones

3

- Conocer los efectos de RB sobre parámetros fisiológicos del portainjerto *P. trifoliata* y plantines cítricos

4

Caracterización genética del genotipo RB.

## Objetivo específico 1. Determinar la agresividad de RB por reacción biológica en indicadoras



Test biológico según protocolo de Garnsey *et al.*, 1987:

- Invernadero a prueba de insectos con condiciones de temperatura controlada (18-26°C).
- **Inoculación de aislados en un set de plantas indicadoras:**
  - Lima mejicana
  - Naranja dulce cv. *Madame Vinous*
  - Naranja Agrio
  - Pomelo cv. *Duncan*



❖ 5 aislados de la colección de CTV de reacción conocidos y el aislado RB



**Evaluación del tipo y severidad de síntomas**

# Resultados

❖ El aislado RB indujo síntomas suaves de VC y hoja de cuchara.

Table 1. Result of biological indexing

Isolate	Biological indexing										
	ML*				SO		DG			SW	
	VC**	LC	Vck	SP	ST	SY	ST	SY	SP	SP	
RB-9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TR7-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DSST-25	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
I58-5	++	+	+	+++	+	-	++	-	-	-	-
I58-10	++	+	-	+++	++	-	-	-	-	-	-
I58-28	++	++	+	+++	+++	+++	++	-	-	-	+
UY-10	+++	++	-	+++	++	-	++	-	-	-	+
UY-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\* Indicators plants ref.: ML- Mexican lime; SO- Sour orange; DG- Duncan grapefruit;

SW: Sweet orange.

\*\*Symptoms ref.: VC- vein clearing; LC- leaf cupping; Vck- vein corking; ST- stunting; SY- seedlings yellows; SP- stem pitting. Symptoms intensity ref.: - absence; + mild; ++ moderate; +++ severe.

UY-1: Negative control; UY-10: Positive control.



Fig.1. Symptoms induced; a and b: mild and moderate vein clearing (VC) in ML; c: leaf cupping (LC) in ML; d: moderate vein corking (Vck) in ML; e: seedling yellow in sour orange; f: stem pitting in ML.

## Objetivo 2. Evaluar la eficiencia de transmisión de RB por pulgones

### 1. Colonia de áfidos libre de virus



24 hrs



Plantas RB, VT, T con brotes tiernos

### 2. Ensayo de transmisión

48 hrs



Plantas de LM receptoras con brotes tiernos, 20 plantas/genotipo

- Cada planta será analizada por ELISA o RT-PCR cada 3 meses para constatar la infección, durante 1 año

## Eficiencia de transmisión (%)

Ensayo	aislados	
	VT	RB
1	0	6
2	0	17
	<b>158</b>	<b>RB</b>
3	0	22
4	33	16

✓ RB tiene buena eficiencia de transmisión



### Objetivo 3. Conocer los efectos del genotipo RB sobre parámetros fisiológicos del portainjerto *P. trifoliata* y plantines de cítricos.

- tasa y eficiencia fotosintética (ACO<sub>2</sub>, Fv/Fm, Fo)
- estrés oxidativo
- respuesta enzimática
- variables relacionadas al crecimiento vegetal (área foliar, diámetro de tronco, SPAD)
- evolución del título viral

## Tratamientos:

- 1- *P.trifoliata*, sin virus
- 2- *P.trifoliata* + RB

Portainjerto

- 3- Lima Mexicana/*P. trifoliata*, sin virus
- 4- Lima Mexicana/*P. trifoliata* + RB

Indicadora

- 5- Naranja W.Navel/*P. trifoliata*, sin virus
- 6- Naranja W. Navel/*P. trifoliata* + RB

Plantín cítrico

# Aún se están realizando evaluaciones

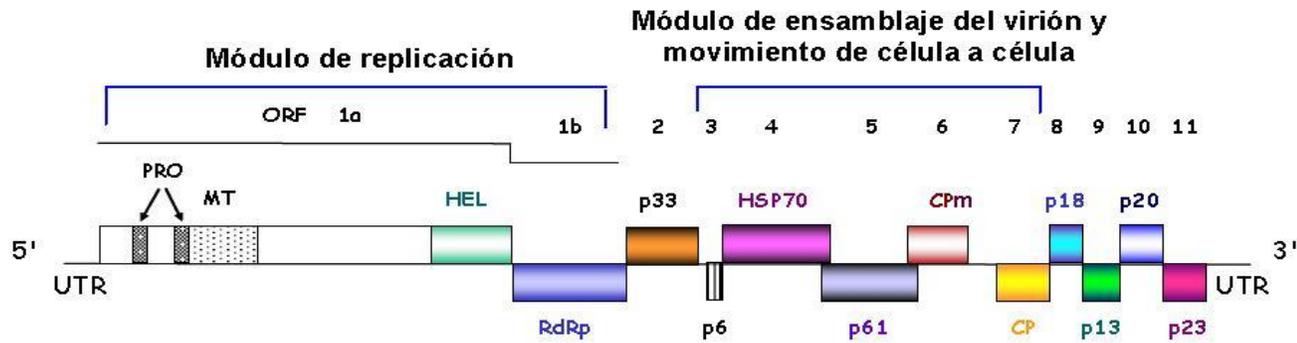
	28/02/2017		28/02/2018		03/01/2019		06/11/2019		
Planta	diámetro	Altura (cm)	poda						
1	0.7		0.7		1	110	1.1	140	
2	0.6		0.7		0.9	107	1.1	149	
3	0.6		0.8		1	108	1	100	
4	0.5		0.6		0.8	118	1	144	
5	0.6		0.7		0.9	139	1	100	
6	0.4		0.6		0.8	42	0.8	116	69
7	0.5		0.8		0.8	47	0.8	110	59
8	0.5		0.7		0.9	64	1	92	92
9	0.4		0.6		0.8	84	0.8	98	
10	0.5		0.7		0.8	100	0.9	98	
11	0.5		0.6		1.1	75	1.1	136	89
12	0.5		0.7		0.8	51	1	180	81
13	0.5		0.8		1.0	109	1.3	129	84
14	0.5		0.8		1.0	88	1.4	127	88
15	0.6		0.7		1.0	100	1.3		
16	0.6		0.6		1.0	57	1.2		
17	0.6		0.6		0.8	31	0.9		
18	0.6		0.7		1.1	86	1.2		
19	0.7		0.8		0.9	S/D	0.7		
20	0.6		0.7		0.8	18	1		

**[[ (Abs 532 - Abs 600) / 156 ] / peso seco (g)] \* 5 \* 1000**

m mol MDA g-1 peso seco

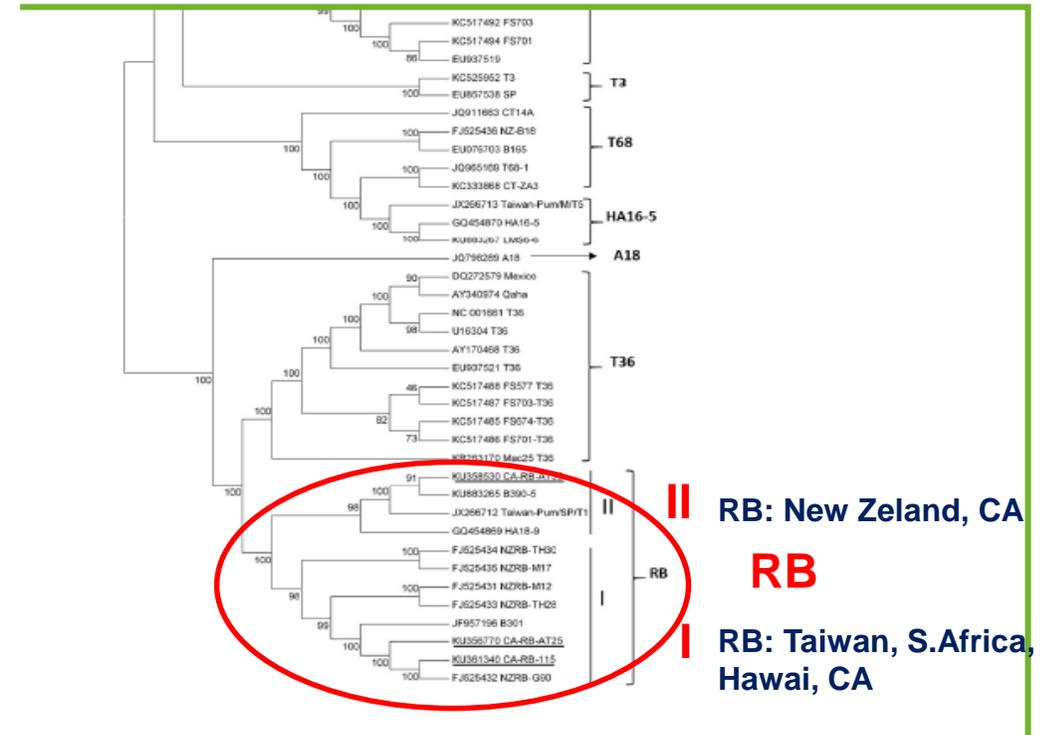
MDA	Muestra	Peso Fresco (mg)	Peso Seco (mg)	Absorvancia		diferencia absorv	dif abs/156	% peso seco	*5	*1000	MDA	
				532nm	600nm							
	21	0.251	0.072	0.138	0.023	0.115	0.0007	0.010	0.051	50.91	71.99	N-
	22	0.252	0.095	0.326	0.051	0.275	0.0018	0.019	0.093	93.07		
	27	0.251	0.064	0.196	0.026	0.17	0.0011	0.017	0.085	85.14		
	28	0.250	0.095	0.315	0.059	0.256	0.0016	0.017	0.087	86.55	88.02	N rb
	30	0.250	0.0850	0.274	0.029	0.245	0.0016	0.018	0.092	92.38		
	12	0.253	0.094	0.403	0.200	0.203	0.0013	0.014	0.069	69.22		
	15	0.255	0.093	0.305	0.076	0.229	0.0015	0.016	0.079	78.92	74.07	LM-
	16	0.253	0.093	0.251	0.052	0.199	0.0013	0.014	0.069	68.58		
	17	0.250	0.080	0.245	0.056	0.189	0.0012	0.019	0.095	94.65		
	18	0.252	0.094	0.245	0.051	0.194	0.0012	0.013	0.066	65.59	74.55	LMrb
	20	0.252	0.086	0.222	0.038	0.184	0.0012	0.014	0.069	69.38		
	RB-Lm					0						
	RB-T					0						

# Objetivo 4. Caracterización genética del genotipo RB

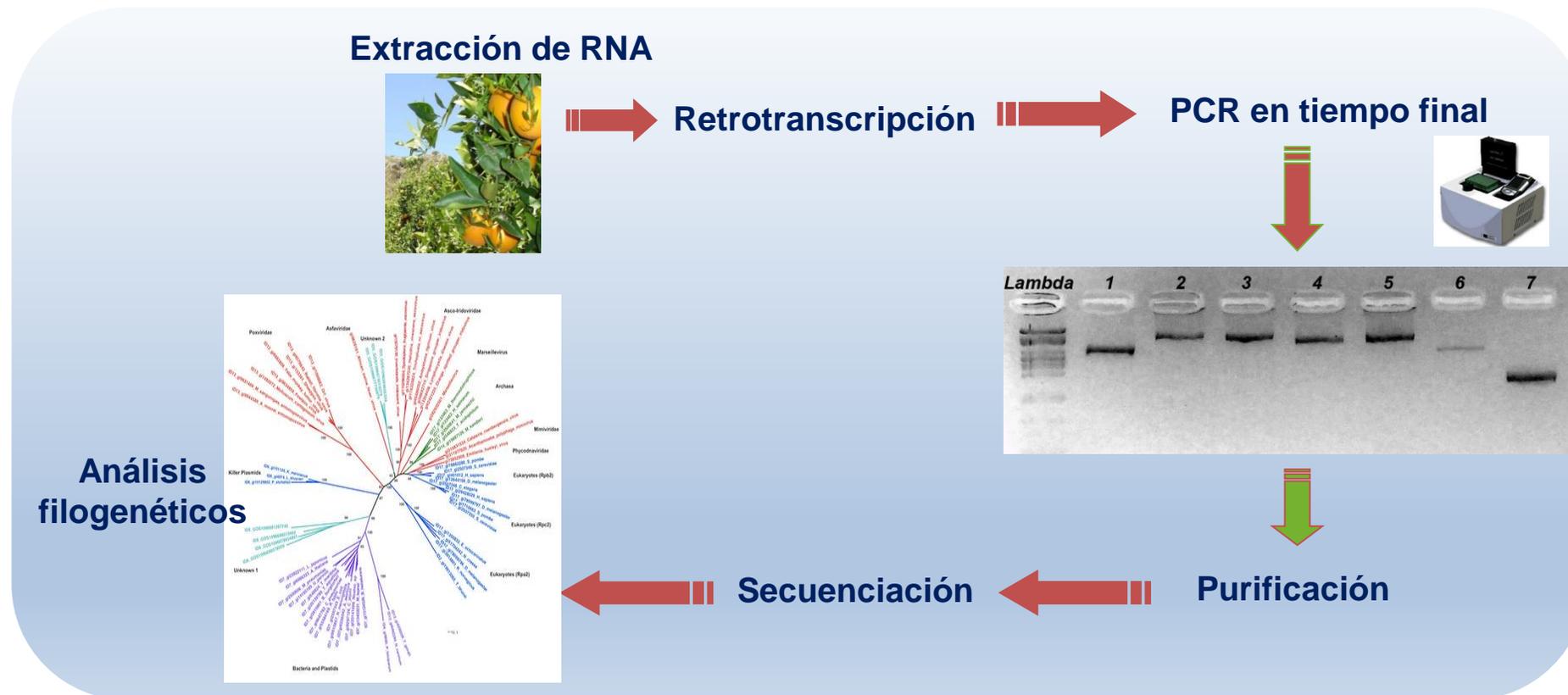


Números correlativos indican los 12 marcos de lectura abierta. Las cajas representan los genes y las anotaciones inferiores a los números indican las proteínas que codifican.

Fuente: Ruiz-Ruiz, 2009



## Metodología: Secuenciación SANGER/NGS



❖ Objetivo no concluido, dificultades con la secuenciación

## Resultados preliminares

- ❖ La variante RB local no genera declinamiento
- ❖ Genera los síntomas de un aislado suave
- ❖ Se trasmite en forma eficiente por pulgones e injerto
- ❖ Se multiplica en forma lenta en *P. trifoliata*
- ❖ Tiene efectos fisiológicos sobre plantines de la indicadora
- ❖ Estaría relacionada genéticamente a las variantes de Nueva Zelanda

- **Colaboración y asesoramiento técnico:**
- ❖ **Indexaje Biológicos:** Ana Bertalmío y Roque Rolón
- ❖ **Caracterización molecular y ajustes de técnicas:** Léster Hernández, Matías Salvo, María José Benítez y Ana Arruabarrena
- ❖ **Evaluación de parámetros fisiológicos y bioquímicos:** Alvaro Otero y Delia Machado
- ❖ **Análisis de resultados:** Diego Maeso, Ana Bertalmío, Léster Hernández, María José Benítez, Fernando Rivas y Rodney Colina



**Muchas Gracias!**

[Irubio@inia.org.uy](mailto:Irubio@inia.org.uy)

[dmaeso@inia.org.uy](mailto:dmaeso@inia.org.uy)