



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de tesis doctoral: "Vectores de transmisión de CPsV"

Tesista: Lic. Melina Ailin Simeone

Director/a: Dra. María Laura García

Año 2023

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CCT-La Plata-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. María Laura García.

Parte de los resultados obtenidos durante el presente trabajo de tesis han dado origen a la siguiente publicación:

Detection of citrus psorosis virus by RT-qPCR validated by diagnostic parameters (2020), Plant Pathology. DOI: 10.1111/ppa.13341

Mi agradecimiento,

A la Dra. María Laura García, por la dirección de este trabajo, su paciencia, dedicación, tiempo y exceso de comas.

Al Ing. Claudio Gómez y su equipo de trabajo en el CUIS INTA-Concordia, al Dr. Juan Pedro Bouvet y la Lic Giovanna Joris. Sin su tiempo, conocimiento y colaboración esta tesis no hubiera sido posible.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme formado profesionalmente, deseando contra todo pronóstico que siempre permanezca libre, pública y gratuita.

A la Agencia Nacional de la Promoción de la Investigación y al CONICET, por las becas que permitieron que este trabajo se realice.

A todos mis compañeros de VV, actuales y previos. Por la predisposición y compañerismo, voluntad para discutir resultados, colaborar con experimentos y especialmente regarme las plantas. Después de todas las contaminaciones, carencias, arreglos con alambre, burbujas pandémicas y pizzas de gordough. GRACIAS A TODOS, en especial a Anita, Lu y Facu. Y Pau, que es VV honoraria.

Al equipo de CPA del instituto, por su ayuda imprescindible en especial a Maga y Lari, por toda la asistencia al momento de picar miles de hojas

Al equipo de R3 por permitirme usar el equipo necesario para todas las RT-qPCRs de esta tesis.

A Gaitán Silvio, del Vivero el desconocido, por las plantas cedidas.

A mi marido Nicolás por todo el apoyo logístico, emocional y en especial la paciencia.

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO 1:</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 Cultivo de cítricos en el mundo y en la Argentina</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 Enfermedades que afectan cítricos</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Enfermedades del “grupo psorosis”.....	14
<b>1.3 Psorosis de los cítricos</b> .....	<b>20</b>
1.3.1 Sintomatología.....	20
1.3.2 Agente causal: citrus psorosis virus.....	22
1.3.2.1 Morfología de CPsV.....	22
1.3.2.2 Organización genómica de CPsV.....	23
1.3.2.3 Taxonomía, filogenia del género <i>Ophiovirus</i> .....	25
1.3.2.4 Transmisión natural.....	26
1.3.2.5 Métodos de diagnóstico de psorosis utilizados en la Argentina y control de la enfermedad.....	28
1.3.2.6 Hospedantes experimentales.....	30
<b>1.4 Objetivo general</b> .....	<b>31</b>
<b>1.5 Objetivos específicos</b> .....	<b>31</b>
<b>1.6 Hipótesis</b> .....	<b>31</b>
<b>CAPÍTULO 2:</b> .....	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Reactivos químicos</b> .....	<b>34</b>
<b>2. Aislamientos virales</b> .....	<b>34</b>
<b>3. Electroforesis en geles de agarosa</b> .....	<b>35</b>
3.1 Estimación del peso molecular de los productos de PCR.....	35
3.2 Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de agarosa.....	36
<b>4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos</b> .....	<b>36</b>
4.1 Extracción y purificación de RNA total.....	36
4.2 Extracción y purificación de DNA total.....	38
<b>5. Reacciones enzimáticas</b> .....	<b>38</b>
5.1 Digestión con DNAsa.....	38
5.2 Síntesis de cDNA (transcripción reversa, RT).....	38
5.3 Reacción de PCR a tiempo final.....	39
5.5 Reacción de PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	39
<b>6. Inoculación viral mediante injerto</b> .....	<b>40</b>
<b>7. Concentración de zoosporas a partir de raíz de cítrico</b> .....	<b>41</b>
<b>8. Origen de muestras vegetales</b> .....	<b>42</b>
<b>9. Ensayo biológico para el diagnóstico de psorosis de los cítricos: IB</b> .....	<b>43</b>

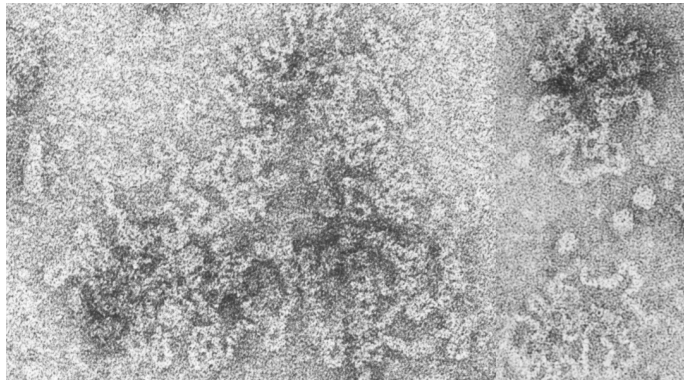
<b>10. Análisis estadístico.....</b>	<b>44</b>
<b>11. Cebadores.....</b>	<b>46</b>
11.1 Detección diferencial para <i>Olpidium virulentus</i> , <i>bornovanus</i> y <i>brassicae</i> .....	47
<b>12. Secuenciación.....</b>	<b>48</b>
<b>CAPÍTULO 3: DETECCIÓN DE CPsV POR RT-qPCR.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1 Introducción.....</b>	<b>50</b>
3.1.1 Indexing Biológico para el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos.....	50
3.1.2 Control de la enfermedad.....	52
3.1.3 Enfermedades del “grupo psorosis”.....	55
<b>3.2 Objetivos.....</b>	<b>57</b>
<b>3.3 Hipótesis.....</b>	<b>57</b>
<b>3.4 Resultados.....</b>	<b>58</b>
3.4.1 Criterio de selección de las muestras a analizar.....	58
3.4.2 Diagnóstico de CPsV: concordancia entre resultados del IB y RT-qPCR.....	60
3.4.2.1 Estadísticos evaluados.....	61
3.4.2.2 Análisis estadístico comparativo entre ambas técnicas.....	62
3.4.3 Concordancia entre la observación de síntomas y la técnica de RT-qPCR en cada plantín indicador.....	64
3.4.4 Concordancia entre la observación de síntomas y la técnica de RT-qPCR en cada brotación.....	65
3.4.5 Correlación entre intensidad de síntomas y carga viral.....	67
3.4.6 Aplicación de la técnica de RT-qPCR y su incorporación a la normativa argentina vigente.....	69
3.4.7 Presencia de CCGaV en el NEA, NOA y Salto Grande, Uruguay.....	69
<b>3.5 Discusión.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6 Conclusiones.....</b>	<b>75</b>
<b>3.7 Perspectivas.....</b>	<b>76</b>
<b>CAPÍTULO 4:.....</b>	<b>77</b>
<b>TRANSMISIÓN DE CPsV POR ÁFIDOS.....</b>	<b>77</b>
<b>4.1 Introducción.....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Áfidos como posible vector de CPsV.....	78
4.1.2 Biología de áfidos.....	82
4.1.2.1 Mecanismos de transmisión de virus por insectos.....	86
Transmisión circulativa o persistente.....	86
Transmisión no circulativa: semi persistente y no persistente.....	87
4.2 Transmisión de citrus tristeza virus por <i>T. citricida</i> .....	88
<b>4.3 Objetivos.....</b>	<b>89</b>
<b>4.4 Hipótesis.....</b>	<b>89</b>
<b>4.5 Resultados.....</b>	<b>90</b>
4.5.1 Selección y recolección de áfidos.....	90
4.5.2 Identificación y saneamiento de las especies de áfidos recolectadas.....	90

4.5.2.1 Metodología para la recolección de áfidos durante los ensayos.....	92
4.5.2.2 Integridad del RNA total de afidos y optimización de la RT-PCR para verificar su calidad.....	94
4.5.3. Ensayos de adquisición de CPsV por áfidos.....	95
4.5.3.1 Ensayo 1: Adquisición de CPsV por <i>T. citricida</i> y <i>A. spiraecola</i> en NDP.....	96
4.5.3.2 Ensayo control de adquisición de CTV por <i>T. citricida</i> en NDP y LR.....	98
4.5.3.3 Ensayo 2 de Adquisición de CPsV por <i>T. citricida</i> en LR y NDP.....	99
4.5.3.4 Ensayo 3 de Adquisición de CPsV por <i>T. citricida</i> en LR y NDP.....	101
4.5.3.5 Ensayo 4 de Adquisición de CPsV por <i>A. gossypii</i> .....	103
4.5.4 Ensayos de transmisión de CPsV por <i>T. citricida</i> y <i>A. gossypii</i> .....	105
4.5.4.1 Ensayo 1 de transmisión de CPsV por <i>T. citricida</i> .....	106
4.5.4.2 Ensayo 2 de transmisión de CPsV por <i>A. gossypii</i> .....	107
<b>4.6 Discusión.....</b>	<b>109</b>
<b>4.7 Conclusiones.....</b>	<b>113</b>
<b>4.8 Perspectivas.....</b>	<b>114</b>
<b>CAPÍTULO 5:.....</b>	<b>115</b>
<b>TRANSMISIÓN DE CPsV POR <i>Olpidium</i> spp.....</b>	<b>115</b>
<b>5 Introducción.....</b>	<b>116</b>
<b>5.1 Biología de <i>Olpidium</i> spp.....</b>	<b>116</b>
5.1.1 Colonización de raíz.....	118
5.1.2 Patogenicidad de <i>Olpidium</i> spp.....	120
<b>5.2 Taxonomía.....</b>	<b>121</b>
5.2.1 Múltiples nombres para <i>O. brassicae</i> .....	121
5.2.2 <i>Olpidium</i> spp. en la era molecular.....	122
<b>5.3 Transmisión de virus por <i>Olpidium</i> spp.....</b>	<b>123</b>
5.3.1 Antecedentes de transmisión de ophiovirus por <i>Olpidium</i> spp.....	124
<b>5.4 Objetivos.....</b>	<b>128</b>
<b>5.5 Hipótesis.....</b>	<b>128</b>
<b>5.6 Resultados.....</b>	<b>129</b>
5.6.1 Presencia de <i>Olpidium</i> spp. en raíces de <i>Citrus lemon</i> , <i>Poncirus trifoliata</i> , <i>Citrus sinensis</i> L. y <i>Citrangae troyer</i> .....	129
5.6.1.1 Optimización del procedimiento de extracción de zoosporas y su detección....	129
5.6.2 Adquisición de CPsV por zoosporas de <i>Olpidium</i> spp.....	135
5.6.2 Transmisión de CPsV mediada por concentrados de zoosporas de <i>O. virulentus</i> ....	139
5.6.2.1. Ensayo 1 de transmisión.....	139
5.6.2.2. Ensayo 2 de transmisión.....	141
<b>5.7 Discusión.....</b>	<b>145</b>
<b>5.8 Conclusiones.....</b>	<b>148</b>
<b>5.9 Perspectivas.....</b>	<b>149</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>151</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>154</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>173</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>173</b>
<b>Publicaciones.....</b>	<b>175</b>



# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN GENERAL



## 1.1 Cultivo de cítricos en el mundo y en la Argentina

Se le llama cítrico al conjunto de especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Poncirus* y *Fortunella*, de la familia Rutaceae. Dentro del género *Citrus* se consideran tres especies verdaderas: *Citrus reticulata* (mandarina), *Citrus grandis* (pomelo) y *Citrus medica* (cidro), siendo todas las restantes híbridos (Figura 1) de estas tres (Moore, 2001).



Figura 1: Parcela de *Citrus sinensis*. Tomado de <https://intainforma.inta.gob.ar/> (2023)

Los cítricos son los árboles frutales más antiguos de la historia. Los primeros registros de uso humano de cultivo de cítricos datan del 2100 AC, pero su consumo como fruta comestible solamente comenzó a ser relevante durante el siglo XVIII, siendo el naranjo dulce la primer especie de interés comercial.

El consumo mundial de cítricos se masificó durante el siglo XIX, con los mayores países productores iniciando exportaciones de fruta fresca (Navarro, 2012). La producción masiva ilustró por primera vez la necesidad de avances en investigaciones

científicas para el mejoramiento de los cultivares, así como la resolución de problemas relacionados a patógenos. En la actualidad los cítricos son cultivados en casi todas las regiones del mundo que se encuentran dentro de la banda de latitud 40°. Se los utiliza para consumo como alimento, fuente de fragancias y uso medicinal.

A nivel mundial se producen 144 millones de toneladas de cítricos anualmente (FAO, 2021) provenientes de más de 140 países, cuyas condiciones de cultivo son altamente variables. Para ello la investigación científica propició la adaptación del cultivo a suelos alcalinos, salinos, climas diversos, entre otros. (Navarro, 2012).

El primer productor mundial de cítricos es China, con 39 mil toneladas anuales, seguido de Brasil con 15 y España con 5. Argentina se encuentra en el sexto puesto (Figura 2) con un volumen de exportación de más de 3 mil toneladas anuales de los cuales 2 corresponden a limón (Figura 3), colocando a nuestro país en el primer exportador mundial de limones (FEDERCITRUS 2022).



Figura 2: Producción mundial de frutas cítricas frescas en diversos países. Año 2021/2022 (en miles de toneladas) .Tomado de FEDERCITRUS 2023.

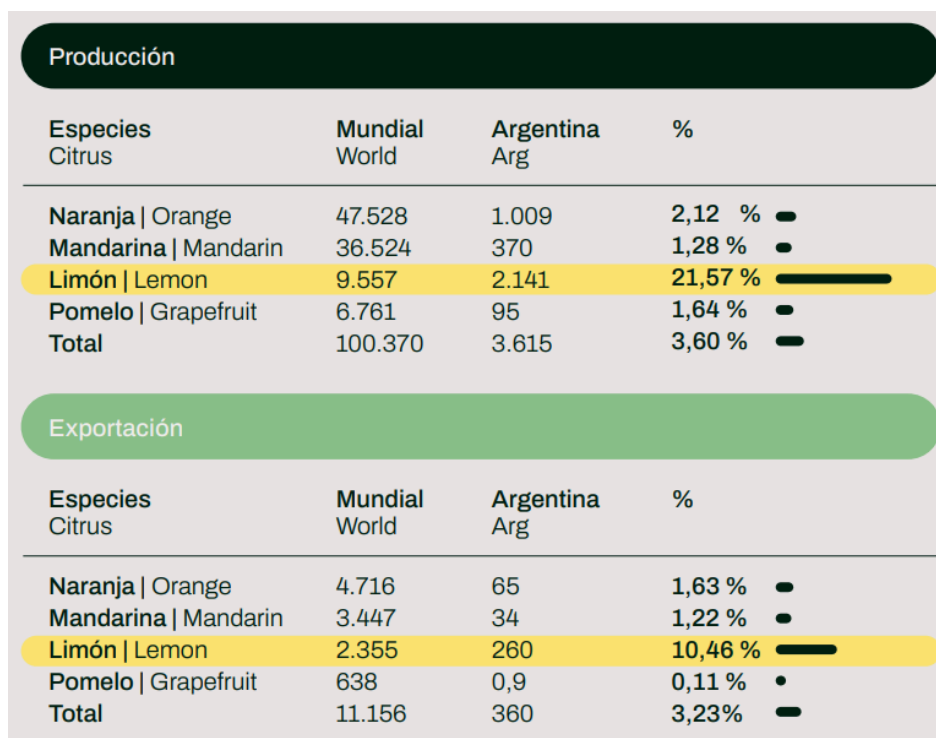


Figura 3: Producción y exportación de frutas cítricas frescas en Argentina en miles de toneladas durante el período 2021/2022. Tomado de FEDERCITRUS 2023.

Nuestro país produce mayoritariamente limón, mandarina, naranja, pomelo y, en menor escala, lima. Existen dos regiones geográficas productoras de cítricos, el Noroeste Argentino (NEA), que incluye la región mesopotámica, provincias de Entre Ríos, Corrientes y Misiones, y ciudades del norte de la provincia de Buenos Aires, como San Pedro; y el Noroeste Argentino (NOA), que abarca las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (FEDERCITRUS 2023, Figura 4).

Provincias Province	Limón Lemon	Naranja Orange	Mandarina Mandarin	Pomelo Grapefruit	Total Total	Distribución regional Regional distribution
Entre Ríos	16.200	301.714	115.828	5.030	438.772	NEA 33,87%
Misiones	15.000	16.000	18.000	8.000	57.000	
Corrientes	80.850	344.488	189.953	10.625	625.916	
Buenos Aires	2.760	32.865	840	1.120	37.585	
Formosa	14.115	7.157	3.765	39.616	64.653	
Jujuy	91.000	150.000	16.800	9.000	266.800	NOA 67,92%
Salta	203.940	54.625	3.960	16.890	279.415	
Tucumán	1.715.000	39.180	7.100	4.300	1.765.580	
Catamarca	2.500	62.533	13.362	0	78.395	
<b>Total</b>	<b>2.141.365</b>	<b>1.008.563</b>	<b>369.608</b>	<b>94.581</b>	<b>3.614.116</b>	

Figura 4: Localización de la producción cítrica Argentina, en toneladas. Tomado de FEDERCITRUS 2023.

La actividad cítrica argentina concentra a más de 5000 productores distribuidos en 10 provincias. Existen 75 empaques de frutas cítricas, 22 plantas industriales para el procesamiento de fruta y el sector emplea a más de 90.000 trabajadores tanto permanentes como temporarios (SENASA, 2023).

El volumen total de cítricos frescos exportado por Argentina es de más de 3.600 toneladas, que representan el 3,2% del comercio mundial de cítricos frescos. Las exportaciones argentinas representan en relación con las exportaciones mundiales el 1,6% de las exportaciones de naranja, el 1,2% de mandarina y el 10,46% del limón (FEDERCITRUS 2023).

Las especies cítricas de interés comercial son muy variables en cuanto a su vigor de crecimiento, tolerancia a distintos tipos de suelo y condiciones de cultivo. Originalmente en la industria los árboles productores de cítricos eran obtenidos a partir de germinación de semillas, pero debido a que estas plantas poseen la capacidad de reproducirse por apomixis la descendencia presenta una gran variabilidad genética lo que se traduce en una gran variabilidad fenotípica. Esto es algo no deseado en la comercialización, que requiere la conservación de las características del producto (Stoltz y Strang, 2005).

Es por esto que en la actualidad todos los cultivares comerciales se originan de yemas injertadas en portainjertos, patrones o “pies” (Figura 5). De esta manera las plantas

productoras son clones de la planta fuente de yemas y todos sus frutos presentan características homogéneas.



Figura 5: Copa de Naranja Valencia (*Citrus maxima* x *Citrus reticulata*) injertada sobre pie de *Poncirus trifoliata*, de aproximadamente diez años de edad utilizada en los ensayos de esta tesis.

En el injerto se unen los tejidos de ambas plantas para constituir un individuo autónomo, generalmente comprendido por un pie o portainjerto que aporta raíces y parte del tronco y la copa de la cual se obtienen los frutos de interés. Las especies utilizadas como pie son seleccionadas en base a su compatibilidad con la especie de interés comercial y su tolerancia a factores del suelo, sensibilidad a hongos, parásitos y enfermedades que se pueden generar en la raíz, además de las condiciones de vigor que le puede conferir a la copa. Esta técnica de propagación también permite realizar cambios de copa, es decir, reemplazar una especie frutal por otra sin desaprovechar el pie ya desarrollado.

## 1.2 Enfermedades que afectan cítricos

El rendimiento de las variedades cítricas de interés comercial depende directamente del crecimiento de las plantas y la producción de fruto, que a su vez depende de factores abióticos como la disponibilidad de agua, nutrientes, luz, niveles de temperatura y humedad y de factores bióticos como es la exposición a patógenos. Una planta se encuentra sana cuando es capaz de llevar a cabo sus funciones fisiológicas de acuerdo a su condición genética. Se dice que una planta está enferma cuando una o más de sus funciones se ven alteradas por organismos patógenos o por condiciones del medio (Agrios, 1996).

En el caso de los cítricos se han descrito enfermedades cuyos agentes causales son bacterias, fitoplasmas, hongos, nemátodos, virus, viroides, defectos genéticos y deficiencias nutricionales. Se ha caracterizado un amplio rango de patógenos que afectan cítricos. En la Figura 6 se encuentran ejemplos de los síntomas que algunos de estos patógenos producen.

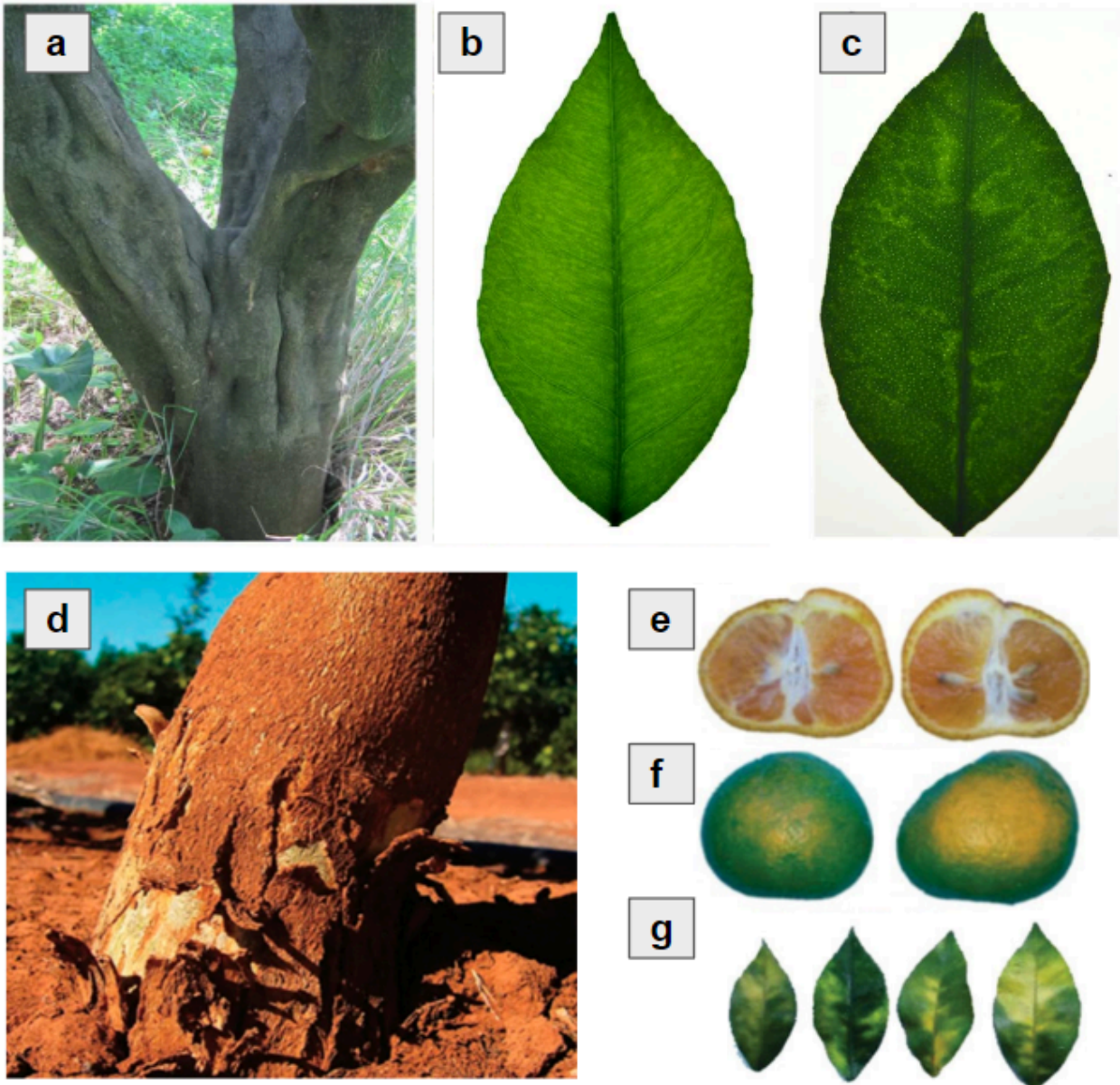


Figura 6: (a-c) Síntomas de la enfermedad citrus concave gum, una enfermedad asociada a un virus de RNA negativo, en naranja dulce Madame Vinous. Tomado de Navarro *et al.* (2018): (a) Concavidades del tronco, (b) Flecos cloróticos en hojas (*flecking*) (c) patrón de hoja de roble. (d) Síntoma de viroide citrus exocortis viroid en pie de *Poncirus trifoliata*, descortezado; tomado de intainforma.inta.gov.ar (e-g) Síntomas de la enfermedad HuanLongBing, causada por la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, en mandarina Kinnow (*Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*): (e) corte longitudinal de fruto asimétrico, (f) vista exterior de fruto asimétrico con coloración invertida (g) clorosis asimétrica en hoja. Tomado de Rao *et al.* (2018).



Como ya se ha mencionado, todas las variedades de cítrico que se comercializan actualmente son diversos híbridos de las especies *C. reticulata* (mandarina), *C. grandis* (pomelo) y *C. medica* (cidro). Debido a esto existe una inmensa variabilidad genotípica en las semillas resultantes de la cruce de cualquiera de las variedades híbridas. Es por esto que al momento de comercializar plantas los productores toman esquejes de la planta de interés y establecen clones de la misma sobre portainjertos, asegurándose así que el fruto comercial cumple con las características deseadas.

Debido al amplio uso de esta técnica en la agricultura, las enfermedades transmisibles por injerto han sido las más importantes para el cultivo de cítricos. Estas enfermedades fueron propagadas a lo largo de la historia de los cítricos, llegando a producir epidemias en todo el mundo.

Los agentes causales más comunes transmitidos por injerto son virus y viroides, y en menor medida bacterias y micoplasmas (Durán Vila y Moreno, 2000). Este tipo de enfermedades son una de las principales causas de pérdidas económicas en el cultivo de cítricos, habiéndose estimado pérdidas en la producción mundial de hasta el 25% en años anteriores (Moreno y Roistacher 1990). En algunos casos la pérdida es directa por el cese de producción de los árboles infectados, mientras que en otro los daños son indirectos, causados por la pérdida de vigor y longevidad de la planta, decaimiento del crecimiento, disminución en el tamaño del árbol, cantidad o calidad de los frutos o restricciones en la elección de portainjertos.

Algunas enfermedades pueden ser controladas mediante saneamiento y certificación del material vegetal a propagar (Navarro, 1993; Navarro *et al.*, 2002), mientras que otras no sólo son transmitidas con el material vegetal, sino que también pueden transmitirse mecánicamente con herramientas de corte, o por transmisión natural mediante insectos u hongos que actúan como vectores del patógeno. En nuestro país fueron controladas con la implementación de programas de certificación para viveristas y productores en las últimas décadas. El Programa de Certificación Nacional de Cítricos fue implementado en 1998 (Ministerio de Justicia y DDHH, Resolución 149/98 <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/50000-54999/53941/norma.htm>).

Una de las enfermedades transmisibles por injerto que más importancia ha tenido en nuestro país ha sido la psorosis de los cítricos, tratada en este trabajo, que causó epidemia durante décadas debido principalmente a la propagación de yemas infectadas (Moreno *et al.*, 2015).

## 1.2.1 Enfermedades del “grupo psorosis”

El primer reporte de la enfermedad denominada psorosis de los cítricos fue hecho en 1896 por Swingle y Webber (Swingle y Webber, 1896). Desde entonces y hasta su asociación con partículas de aspecto viral en la década de 1980 (Derrick *et al.*, 1988; da Graça *et al.*, 1991) se generó confusión en la literatura con respecto a los síntomas inducidos por CPsV y el resto de las enfermedades del “grupo psorosis” (Moreno *et al.*, 2015). Esto ocurrió mayormente por dos motivos; por un lado, las enfermedades pertenecientes a este grupo (citrus ringspot, concave gum, impietratura y cristacortis) al igual que psorosis de los cítricos, inducen *flecking* en las hojas jóvenes de plantines indicadores (Duran-Vila y Moreno, 2000; Timmer *et al.*, 2000). Por otro lado, como ya se ha mencionado, los árboles infectados con CPsV demoran mucho tiempo (10 a 15 años) en desarrollar el síntoma más característico de la enfermedad a campo que es el descascarado de la corteza. Es decir, los síntomas de *flecking* y manchas cloróticas presentes en hojas jóvenes no son específicos de psorosis, por lo que resultaba imposible saber si los árboles a campo con esta sintomatología presentaban infecciones mixtas con otros virus del “grupo psorosis”.

En la década de 1930 Fawcett encuentra que la enfermedad llamada psorosis era transmisible por injerto (Fawcett, 1932). En 1945 Wallace descubre que el inóculo de corteza de árboles que presentan descortezado es capaz de inducir *flecking* clorótico en hojas jóvenes de plantines jóvenes de invernáculo que luego desaparecían al envejecer la hoja (Wallace, 1945), lo que representó un gran avance para el diagnóstico de la enfermedad. Décadas más tarde Roistacher desarrolla un ensayo biológico, (ver Cap. 3, sección 3.1.1) que permitió el diagnóstico de la enfermedad en 4 a 6 semanas, en lugar de los 10-15 años necesarios para el desarrollo de descamado de la corteza (Roistacher, 1991). El problema generado con este descubrimiento fue la asociación de la enfermedad psorosis de los cítricos con enfermedades que podían ser causadas por otros agentes virales, basándose en la inducción de *flecking* en plantines indicadores.

En 1938 Fawcett y Klotz describen 2 tipos de psorosis, denominadas psorosis A y psorosis B (PsA y PsB, respectivamente), donde la última genera síntomas más agresivos como anillos cloróticos en hojas viejas, pústulas en ramas jóvenes y manchas decoloradas o surcos en los frutos, síntomas no observados en plantas infectadas con PsA (Figura 7; Fawcett y Klotz, 1938).

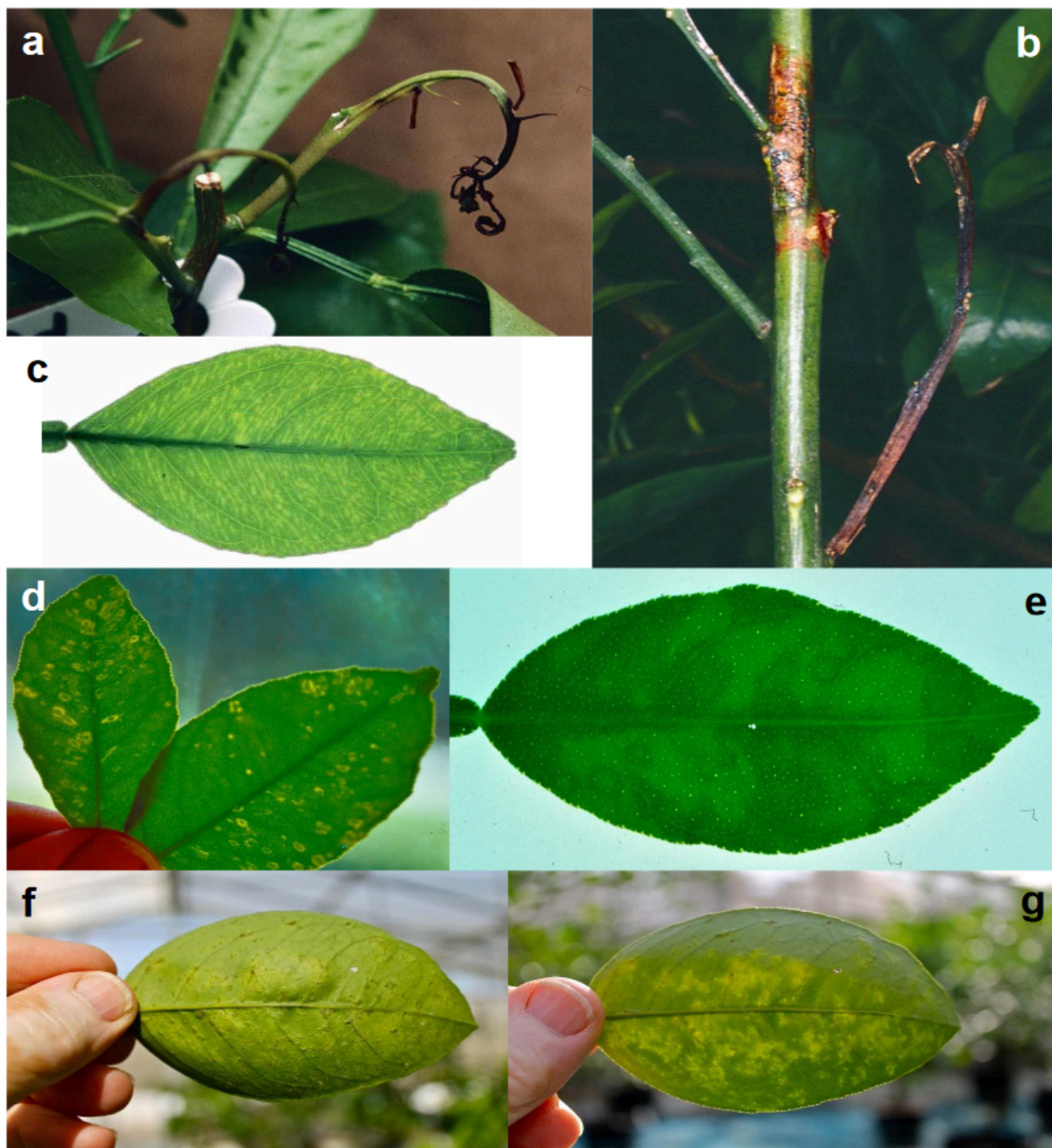


Figura 7: Síntomas de PsA y PsB observados en plantines indicadores. a) Shock necrótico en brotes jóvenes de naranjo dulce Pineapple (NDP) (PsA); b) Pústulas en rama joven de un NDP (PsB); c) *Flecking* clorótico (PsA); d) Anillos cloróticos en hojas jóvenes (PsA); e) Manchas cloróticas en hojas jóvenes (PsA); f) Pústulas impregnadas de goma en hojas viejas (PsB); g) Manchas cloróticas en hojas viejas (PsB). Tomado de Moreno *et al.*, 2015.

En 1957 Wallace observó que plantas infectadas con PsA no desarrollaban síntomas de PsB al infectarlas con este inóculo (Wallace, 1957). Esta observación posibilitó el desarrollo del test de protección cruzada, lo que a su vez permitió la identificación específica de PsA y su diferenciación de otras enfermedades del “grupo psorosis” que no otorgaban esta protección contra los síntomas de PsB. Sin embargo, al evaluarse con esta metodología plantas con infecciones mixtas (de PsA junto con cualquiera de las otras enfermedades del grupo), los resultados de este test relacionaron erróneamente a otras enfermedades con psorosis. Esto reforzó la idea de que esas enfermedades pertenecían al “grupo psorosis” (Wallace, 1968; 1978).

A continuación se presenta la Tabla 1, que resume los síntomas de las diversas enfermedades del “grupo psorosis” en las distintas partes de la planta.

Tabla 1: Resumen de los síntomas producidos por las diversas enfermedades del “grupo psorosis” (Moreno et al, 2015; Da Graca et al, 1991; Whiteside et al, 1988).

Enfermedad	Síntomas en tronco/ramas	Síntomas en hojas jóvenes	Síntomas en hojas maduras	Síntomas en fruto	Síntomas no específicos
Psorosis de los cítricos	Descortezado en infecciones de más de 10-15 años, desintegración del xilema y gomosis (PsA y PsB) Pústulas en tallos y ramas jóvenes (PsB)	<i>Flecking</i> y anillos cloróticos que desaparecen al envejecer la hoja, <i>shock</i> necrótico (PsA y PsB)	Ninguno (PsA) Pústulas y manchas cloróticas (PsB)	Disminución en rendimiento (PsA y PsB)	Muerte de ramas más afectadas por gomosis, eventual muerte de la planta (PsA y PsB)
Citrus ringspot	Ninguno	<i>Flecking</i> que persiste al envejecer la hoja	Anillos cloróticos y manchas necróticas	Disminución en cantidad y calidad	Disminución de la densidad de la copa y eventual muerte de la planta
Impietratura	Visiblemente la morfología no se ve afectada, pero genera necrosis y gomosis en tejido vascular de ramas y pecíolos	<i>Flecking</i> y patrón de hoja de roble que desaparece al envejecer la hoja	Ninguno	Disminución de tamaño, diversos patrones de endurecimiento del exocarpo, gomosis en mesocarpo, generación de protuberancias	Pérdida de hojas durante el verano
Cistacortis	Depresiones verticales en tronco, gomosis	<i>Flecking</i> y hoja de roble que desaparece al envejecer la hoja	Ninguno	Ninguno	Ligera disminución en el tamaño total de la planta
Concave gum	Concavidades en tronco, goma bajo la corteza entre concavidades, exudación de goma a través de quiebres en la superficie	<i>Flecking</i> y hoja de roble que desaparece al envejecer la hoja	Ninguno	Ninguno	Enanismo moderado

La identificación de los agentes causales de cada una de estas enfermedades ocurrió gracias al aumento en la disponibilidad y disminución de costos asociados a los métodos de secuenciación masiva.

Posteriormente, diversos grupos de trabajo demostraron que es posible transmitir algunos aislamientos de psorosis y ringspot a hospedantes herbáceos, ya sea por cuscuta (Price 1965; Desjardins *et al.* 1969) o mecánicamente (Timmer *et al.* 1978; Garnsey y Timmer 1980; Roistacher *et al.*, 1980; Sarachu *et al.* 1988; Navas Castillo *et al.* 1991). Esto fue un gran avance para la purificación del agente viral. En 1988 Garnsey y Timmer aislaron el agente asociado a un aislamiento de ringspot proveniente de una única lesión a *Chenopodium quinoa*, para luego transmitirlo mecánicamente a *Gomphrena globosa* y finalmente a citron. Cuando el inóculo de citron fue injertado en naranjo dulce (*Citrus sinensis* L Osb.) generó descamación de la corteza. Este ensayo demostró que al menos algunos aislamientos de ringspot contenían un virus asociado a la descamación de corteza y que este virus era transmisible a hospedantes herbáceos como *C. quinoa* y *G. globosa* (Garnsey y Timmer, 1988).

Contar con un indicador herbáceo confiable permitió evaluar rápidamente la infectividad de diversas fracciones de extracto crudo de material foliar separadas en un gradiente de sacarosa. Derrick *et al.* (1988) purificaron y fraccionaron en un gradiente de sacarosa un extracto hojas infectadas con un aislamiento de ringspot denominado CPV-4 y encontraron que las fracciones de ese gradiente no eran infectivas individualmente, mientras que la mezcla recuperaba la infectividad. Esto demostró que el virus asociado a ringspot poseía un genoma multipartito (Derrick *et al.*, 1988). En el mismo grupo de trabajo, se obtuvo un antisuero para una proteína de aproximadamente 48 kDa asociada a ambas fracciones infectivas (Barthe *et al.*, 1998), que luego fue demostrado se trataba de la proteína de cubierta (CP) de CPsV (Sánchez de la Torre *et al.*, 1998). Este antisuero permitió la detección de partículas de aspecto viral de dos tamaños distintos mediante microscopía inmunoeléctronica y de la proteína de ~48 kDa mediante análisis por Western Blot a partir de extractos de plantas infectadas (García *et al.*, 1994).

Estos descubrimientos, posteriormente confirmados mediante análisis de aislamientos de psorosis y ringspot provenientes de distintos países (da Graça *et al.* 1991; García *et al.*, 1991a, c, 1994; Navas-Castillo *et al.*, 1993a; Navas-Castillo y Moreno, 1995), demostraron que psorosis y la mayoría de los aislamientos de ringspot presentaban CPsV, mientras que concave gum, impietratura y cristacortis no tenían relación con CPsV (da Graça *et al.*, 1991). Esta conclusión se vio reforzada gracias a la comparación biológica de distintas plantas indicadoras (Navas-Castillo y Moreno 1993a).

A pesar de esto, algunos aislamientos de ringspot de España presentaban síntomas distintos de los de psorosis en cítricos y en *C. quinoa*, no ofrecían protección contra los síntomas de PsB ni evidenciaban presencia de la proteína de cubierta (Navas-Castillo y

Moreno, 1993a, b). Además, plantines de naranjo dulce inoculados sucesivamente con este tipo de ringspot y luego con PsA o PsB presentaban síntomas característicos tanto de ringspot como de psorosis (Moreno, datos sin publicar). Éstos y otros aislamientos de ringspot observados en diversos países eran caracterizados por patrones amarillentos en hojas viejas y frutos, claramente distintos a los patrones de PsB, y fueron posteriormente llamados citrus yellow ringspot (Moreno 2000a, b).

Gracias a la disponibilidad de estas secuencias nucleotídicas y de nuevos anticuerpos poli y monoclonales contra la CP se desarrollaron nuevas técnicas de detección inmuno-enzimática y basadas en RNA (Naum-Onganía *et al.*, 2003; García *et al.*, 1997; Barthe *et al.*, 1998; Alioto *et al.*, 1999; D'Onghia *et al.*, 1998, 2000, 2001; Djelouah *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2002a; Loconsole *et al.*, 2006; Zaneck *et al.*, 2006, García *et al.*, 1996, 1997; Legarreta *et al.*, 2000; Sambade *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2005; Rosa *et al.*, 2007; Barragan-Valencia *et al.*, 2008; Loconsole *et al.*, 2010; de Francesco *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2015).

Hasta la actualidad y gracias a las técnicas de secuenciación masiva se ha podido dilucidar la identidad de los agentes causales de todas las enfermedades que originalmente pertenecían al “grupo psorosis”. En 2018, Navarro *et al.* encontraron mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático un virus a RNA negativo asociado a la enfermedad concave gum y diseñaron un protocolo de RT-PCR para su detección (Navarro *et al.*, 2018a).

A partir del mismo análisis este grupo de trabajo logró identificar un segundo virus a RNA negativo asociado a la enfermedad cristacortis o impietratura, denominado citrus virus A (CiVA) y desarrollaron un protocolo de RT-PCR para su detección (Navarro *et al.*, 2018a). La asociación entre CiVA e impietratura se vio reforzada gracias al trabajo de Beris *et al.* en 2021 y en 2022 De Bruyn *et al.* desarrollaron un método de RT-PCR real time para su detección en cítricos.

Las técnicas de detección específicas desarrolladas permiten identificar a cada uno de estos agentes causales, algo que hasta el momento no era posible mediante la técnica de diagnóstico por Indexing Biológico (IB).

Por otro lado, la identificación de cada uno de estos virus permite conocer la verdadera incidencia de cada uno de ellos en las diversas regiones productoras de cítricos, lo que a su vez permite un mejor monitoreo del estado sanitario de los cítricos que se encuentran en actividad productiva.

## 1.3 Psorosis de los cítricos

La enfermedad psorosis de los cítricos es una de las enfermedades más antigua que afectan plantas. Es la primera virosis de cítricos descubierta en la historia de la citricultura, siendo su primera descripción en el siglo XIX (Swingle y Weber, 1896). También se trata de la primera enfermedad en la que su síndrome completo fue reproducido a partir de la transmisión por injerto (Fawcett, 1932), permitiendo su estudio. En esos viejos reportes siempre se describió como una enfermedad causada por un agente viral, de acuerdo al conocimiento de la fitopatología disponible en esa época.

### 1.3.1 Sintomatología

El síntoma más característico y por el cual la enfermedad lleva su nombre es la descamación en la corteza del tronco y ramas en árboles adultos (Figura 8A). Estos síntomas comienzan a observarse como lesiones pequeñas en árboles de 10-15 años de edad que pueden avanzar lentamente hasta cubrir el tronco y las ramas principales (Roistacher, 1993; Roistacher *et al.*, 1991; Navas-Castillo y Moreno, 1995).

Por debajo de la descamación se observa una desintegración total o parcial de elementos del xilema con formación de goma que impregna la madera y puede causar obstrucción de vasos, lo que provoca decaimiento progresivo de la planta y puede culminar en la muerte de las ramas afectadas. Esta acumulación de goma puede observarse en cortes transversales de las zonas descamadas del tronco, como manchas pardas en la madera. Estos síntomas han sido utilizados como criterio para diagnosticar la enfermedad a campo (Roistacher, 1993; Roistacher *et al.*, 1991). En hojas jóvenes de árboles infectados también se observa *flecking* (Figura 8B) y anillos cloróticos que suelen desaparecer a medida que la hoja envejece (Wallace, 1957).



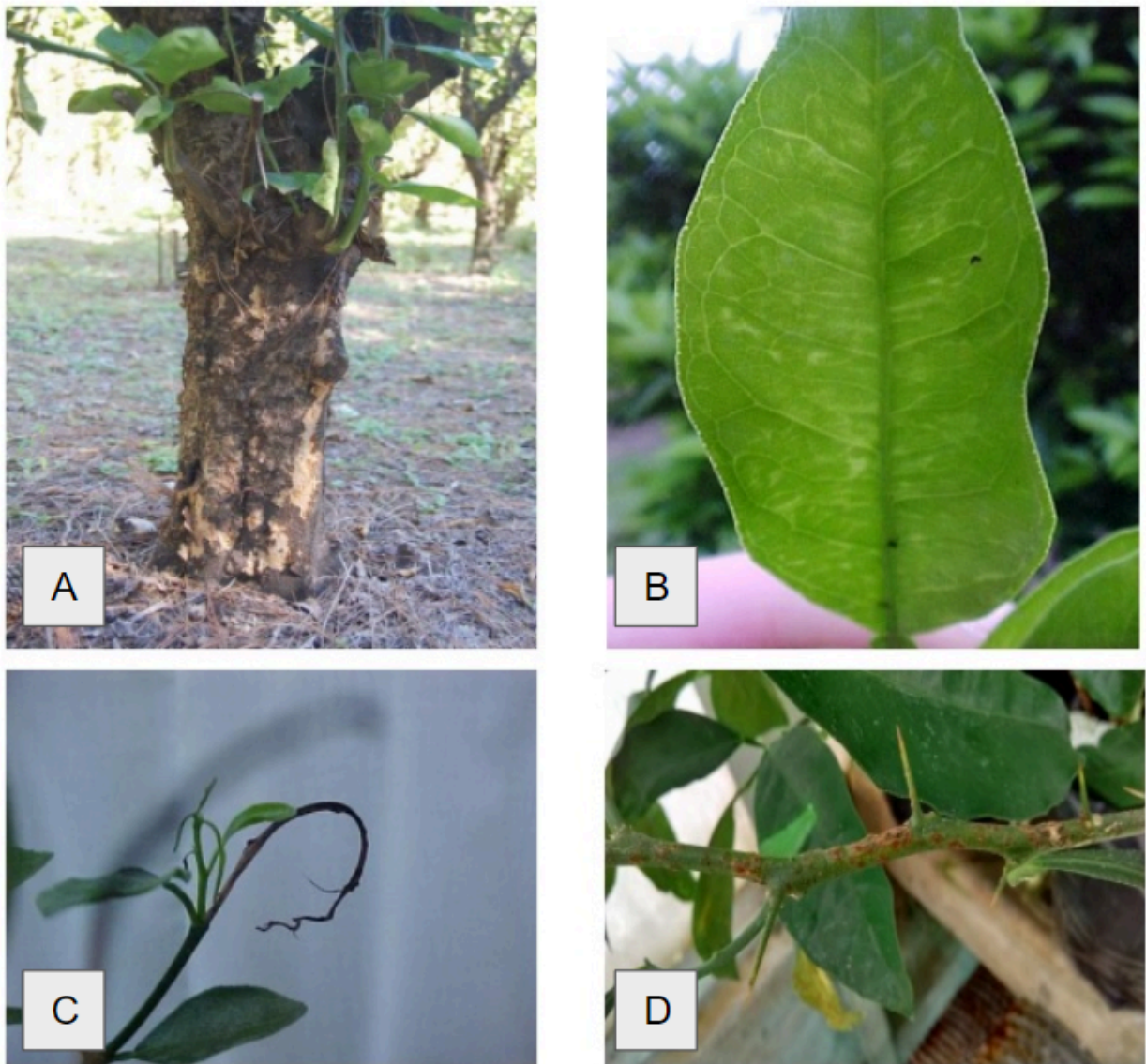


Figura 8: Síntomas de la enfermedad psorosis de los cítricos. A: descortezado (éste síntoma sólo se desarrolla en árboles adultos de más de 10 años), B: *flecking* y manchas cloróticas en brotes y hojas jóvenes, C: shock necrótico en brotes jóvenes, D: pústulas en tallos y ramas jóvenes.

En cuanto a los diferentes aislamientos descritos, se determinó que el agente causal se trataba de la misma especie viral *citrus psorosis virus* (CPsV) (Garcia *et al*, 1991).

En este trabajo de tesis hemos utilizado el aislamiento argentino CPsV 90-1-1 de PsA, perteneciente a la colección que se encuentra en el banco de la EEAA-INTA Concordia, Entre Ríos. Es un aislamiento de PsA que presenta típicamente shock, *flecking* y

manchas cloróticas en plántines jóvenes de naranjo inoculados mediante injerto, y el aislamiento CPsV 243-7 (PsB) que también presenta los síntomas típicos, más agresivos, de PsB.

## 1.3.2 Agente causal: citrus psorosis virus

### 1.3.2.1 Morfología de CPsV

CPsV consiste en nucleocápsides de 3 nm de diámetro que pueden colapsar *in vitro* formando estructuras cerradas y parcialmente ramificadas de 9 nm de diámetro y aproximadamente la mitad de la longitud del contorno circular (Figura 9) (García *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 2000).

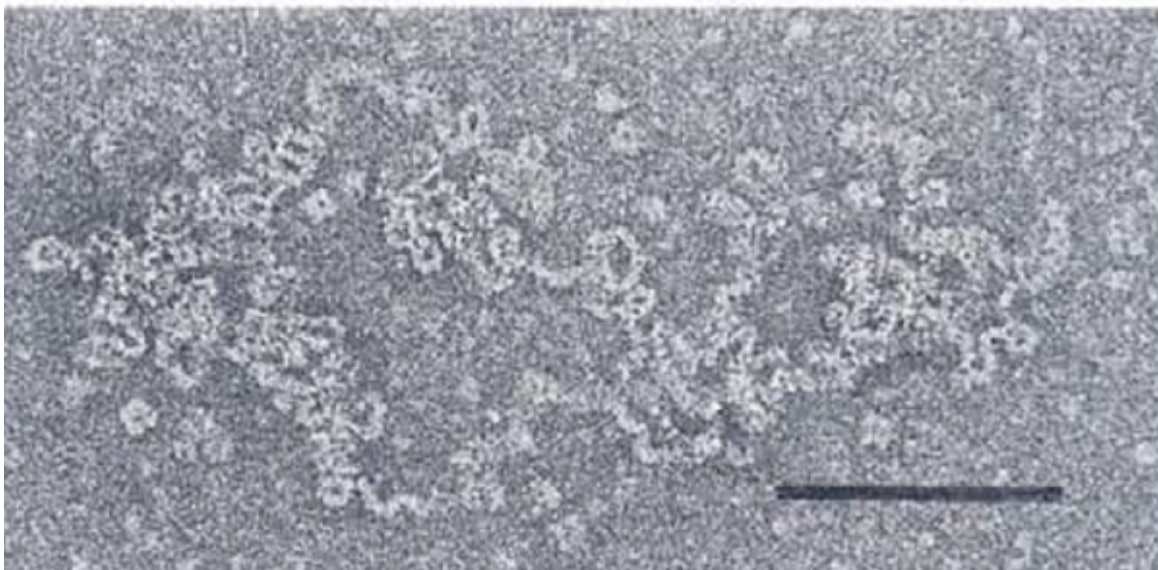


Figura 9: Partículas de CPsV obtenidas de preparaciones parcialmente purificadas. Tinción negativa mediante acetato de uranilo. La barra corresponde a una longitud de 100 nm. Tomado de García *et al.*, 1994.

De acuerdo a su morfología, la organización genómica, polaridad del genoma ssRNA, los hospedantes afectados y la inexistencia hasta ese momento de un grupo de virus

con esas características, se colocó CPsV dentro de un nuevo género que se denominó *Ophiovirus*, posteriormente definiendo la familia *Aspiviridae* dentro del orden Mononegavirales que tuvo como especie tipo a CPsV (García *et al.*, 1994; Milne *et al.*, 2000; García *et al.*, 2018).

El género *Ophiovirus* es el único género de la familia *Aspiviridae* (previamente llamada *Ophioviridae*), pertenecientes al orden Serpentovirales. El género está compuesto por especies virales que infectan plantas y hongos (García *et al.*, 2017).

Los ophiovirus infectan tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, hortalizas, plantas ornamentales, árboles, arbustos y hongos sugiriendo un amplio rango de adaptaciones (Debat *et al.*, 2023).

### 1.3.2.2 Organización genómica de CPsV

El virión se compone de nucleocápsides no envueltas circulares que pueden adoptar varias conformaciones, desde muy enrollada a sinuosa circular abierta. Las partículas se presentan en dos tamaños, 690-760 nm de largo, y de aproximadamente 2000 nm (García *et al.*, 1994) que se corresponden con el tamaño de los RNAs 2, 3 y 1, respectivamente. Estas partículas son muy inestables y su infectividad depende de factores como el pH, fuerza iónica y presencia de agentes reductores (García *et al.*, 1991).

El genoma es segmentado y consiste en tres fragmentos de RNA de simple cadena de polaridad negativa (Figura 10), y como en otros virus con genoma RNA negativo, también presenta partículas virales encapsidando RNA de cadena positiva en mucha menor proporción (García *et al.*, 2018; Kormelink *et al.*, 2011).

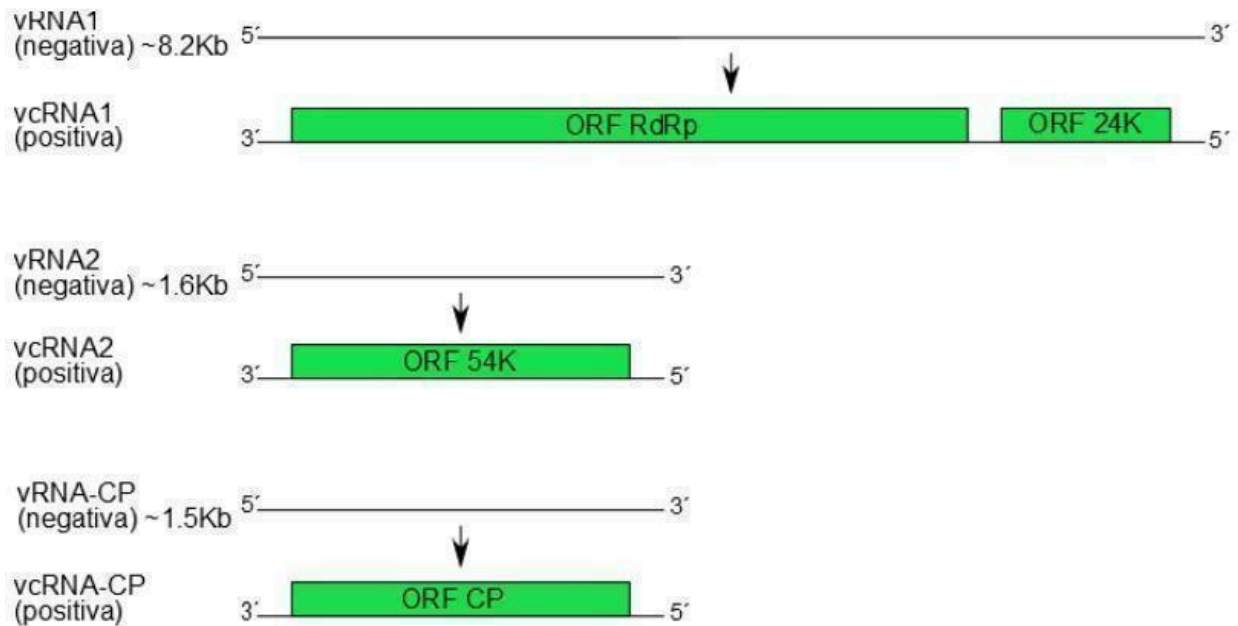


Figura 10: Organización genómica de citrus psorosis virus. Las cajas verdes indican los ORFs que codifican para las proteínas virales. V, viral: cadena de ssRNA de polaridad negativa; VC, viral complementaria: cadena de ssRNA de polaridad positiva.

El RNA1 presenta 8184 nt (Naum-Ongania *et al.*, 2003), en su extremo 5' codifica para una proteína denominada 24K, con función de supresora del silenciamiento génico y, separado por una región intergénica de 109 nt, un segundo gen que codifica para la polimerasa viral de 280K (Naum-Ongania *et al.*, 2003).

El RNA2 posee 1644 nt y contiene la proteína 54K, que es la proteína de movimiento del virus célula a célula y presenta actividad supresora (Robles Luna *et al.*, 2017).

El RNA 3 posee 1447 nt y contiene al gen de la proteína 48K, siendo la proteína de cubierta viral (CP) que es la proteína viral más abundante que se expresa en los diferentes hospedantes del virus (Sánchez de la Torre *et al.*, 1998; Robles Luna *et al.*, 2013).

### 1.3.2.3 Taxonomía, filogenia del género *Ophiovirus*

Actualmente existen siete especies dentro del género *Ophiovirus* (Tabla 2), y una adicional descubierta recientemente, asociada a la enfermedad clorótica del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Japón (Shimomoto *et al.*, 2023) que aún no ha sido aceptada dentro del género por la ICTV.

Como ya se mencionó, actualmente el género *Ophiovirus* comprende siete virus que infectan tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. Actualmente se encuentra disponible el genoma de sólo cuatro especies. En 2023 Debat *et al.* realizaron un análisis metagenómico a partir de los transcriptomas de 1124 plantas obtenidos por Leebens-Mack *et al.* (2019), que incluyen especies de los clados Viridiplantae, Glaucophyta y Rhodophyta. A partir de esta información Debat *et al.* realizaron búsquedas utilizando tBlastn de secuencias similares a las de proteínas de ophiovirus en la base de datos NCBI-refseq. Por otro lado, también realizaron búsquedas de predicciones de la RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) a partir de las secuencias de RdRP de ophiovirus almacenadas en NCBI-refseq.

Esto les permitió encontrar 33 virus nuevos, con secuencias similares a los ophiovirus ya reportados. Su análisis filogenético sugiere que los 33 virus detectados podrían corresponder a nuevas especies.

Tabla 2: Miembros del género *Ophiovirus*, familia *Aspiviridae*, filo Negarnaviricota, subfilo Haploviricotina, clase Milneviricetes, orden Serpentovirales (García *et al.*, 2017)

Virus	Acrónimo	Especie viral
blueberry mosaic associated virus	BlMaV	<i>Ophiovirus vaccinii</i>
citrus psorosis virus	CPsV	<i>Ophiovirus citri</i>
freesia sneak virus	FreSV	<i>Ophiovirus freesiae</i>
lettuce ring necrosis virus	LRNV	<i>Ophiovirus mirafioriense</i>
Mirafiori lettuce big-vein virus	MLBVV	<i>Ophiovirus mirafioriense</i>
ranunculus white mottle virus	RWMV	<i>Ophiovirus ranunculi</i>
tulip mild mottle mosaic virus	TMMMV	<i>Ophiovirus tulipae</i>

CPsV es la especie a partir de la cual se creó el género. Su genoma se encuentra completamente secuenciado al igual que los genomas de MLBVV, LRNV y BIMaV.

Existe una identidad entre las secuencias de aminoácidos de las CP de aislamientos que se encuentra entre el 95 y el 100% para la misma especie detectadas en distintas partes del mundo, particularmente para MLBVV, CPsV, BIMaV y FeSV. El porcentaje de identidad es mucho menor (28 a 59%) en alineamientos entre especies, con la excepción de la identidad entre las secuencias de CP de MLBVV y TMMMV, que es de alrededor del 80%, confirmando la cercanía evolutiva entre estos virus, y entre CPsV y BIMaV.

Con respecto a la transmisión natural de los virus de este género, el grupo de trabajo de Morikawa *et al.*, (1997) determinó que la transmisión de TMMMV ocurre por zoosporas de *Ospidium brassicae*. Este hongo también fue determinado como el vector de transmisión natural de MLBVV en 2001 por Herve Lot *et al.* Lo mismo ocurrió con FeSV en 2002 (Torok y Vetten, 2002) y BIMaV en el 2017 (Shands *et al.*, 2017). Esto deja sólo a CPsV y RWMV sin evidencias del vector de transmisión natural.

#### 1.3.2.4 Transmisión natural

La principal vía por la cual la enfermedad psorosis de los cítricos se ha diseminado ha sido la propagación por injerto con material infectado (Danos, 1990). Los largos períodos de incubación hasta que se evidencia el descortezado (10-15 años) permitió que durante años se propagaran varetas de árboles infectados asintomáticos, aumentando la incidencia de la enfermedad (Moreno *et al.*, 2015). Esto ha sido un factor muy importante que ha dificultado plantear hipótesis acerca de su transmisión natural.

Se ha reportado la potencial transmisión de la enfermedad por semilla en trifoliados como Citrange Carrizo y Citrange Troyer (Bridges *et al.*, 1965; Childs y Johnson, 1966; Pujol y Beñatena, 1965; Pujol, 1966; Campiglia *et al.*, 1976). Sin embargo, estos estudios consistieron en sembrar semillas provenientes de plantas infectadas con CPsV a campo, y observar estos plantines luego de algunos meses. Al observar la presencia de síntomas de *flecking* y manchas cloróticas en el material foliar, los investigadores concluyeron que hubo transmisión por semilla. Los plantines

germinados a partir de las semillas utilizadas en estos ensayos no fueron protegidos de insectos ni aislados del suelo y la determinación de la transmisión se realizó únicamente en base a la observación de síntomas, sin confirmar por métodos moleculares la presencia del agente causal, ya que no se contaba con tales técnicas.

Por otro lado, algunas observaciones sugieren que existe un vector de transmisión natural; en Texas, EEUU, se observó propagación de síntomas como el descortezado en plantines de *Citrus paradisi* (pomelo) a campo (Timmer, 1974; Timmer y Garnsey, 1980). Estudios epidemiológicos previamente realizados en Argentina y EEUU sugieren difusión natural de la enfermedad mediada por un insecto chupador en función de la distribución errática en la aparición de síntomas (Pujol y Beñatena, 1965; Beñatena y Portillo, 1984; Danós, 1990; Gottwald *et al.*, 2005). Portillo (1983) y Beñatena y Portillo (1984) proponen a *Toxoptera spp.* y *Aphis citricola* como probables vectores (Figura 11).



Figura 11: A: adultos (negros) y ninfas (marrones) de *Toxoptera citricida*. B: adulto (insecto grande) y ninfas (insectos pequeños) de *Aphis citricola*. Cedido por el Dr. Juan Pedro Bouvet.

Los áfidos son vectores de un gran número de virus de plantas (Whitfield *et al.*, 2015). Sus mecanismos moleculares de transmisión son muy variables y se ha demostrado que los áfidos son capaces de transmitir citrus tristeza virus (CTV) (Hermoso de Mendoza, *et al.*, 1984), un closterovirus muy estudiado, endémico en nuestra región (Plata y Anderson, 2002). Se han llevado a cabo varios estudios que proponen a los áfidos como posibles vector natural de CPsV. En el Capítulo 4 se describirá en detalle los antecedentes y el trabajo realizado en este trabajo de tesis.

Otro posible vector es el hongo de suelo *Olpidium virulentus*. A lo largo del siglo XXI distintos grupos de trabajo han determinado que es capaz de transmitir 5 de los 6 miembros de la familia *Aspiviridae*, al cual pertenece CPsV (Dorst, 1975; Campbell y Lot, 1996; Lot *et al.*, 2002; Morikawa *et al.*, 1997; Shands *et al.*, 2017). *O. virulentus* es un parásito obligado con hospedador no específico cuyas zoosporas invaden raíces en condiciones de suelo arcilloso, húmedo y de poco drenaje. Los virus transmitidos por este hongo ingresan dentro de su protoplasto o bien se asocian a su membrana e ingresan a la planta sana cuando el hongo coloniza sus raíces (Lay *et al.*, 2018). En el Capítulo 5 de esta tesis se describirán los experimentos realizados con el objetivo de verificar si CPsV puede ser transmitido por *Olpidium* spp..

#### 1.3.2.5 Métodos de diagnóstico de psorosis utilizados en la Argentina y control de la enfermedad

La dispersión de la enfermedad se debe en gran medida al uso de material infectado. Durante la década de los '80 el mercado cítrico se vio afectado en nuestro país y en otras regiones productoras del mundo por una epidemia provocada por psorosis de los cítricos (Anderson, 2000). Los citricultores se vieron ante la necesidad de identificar plantas enfermas para así limitar la transmisión de la enfermedad a plantas sanas y llevar a cabo un método de saneamiento del material a propagar (Navarro *et al.*, 2002).

La enfermedad sólo fue controlada en nuestro país gracias al programa nacional de certificación denominado PROCITRUS (Programa de Mejoramiento Varietal y Sanitario en Citrus), implementado a partir de 1994, llevado a cabo e impulsado en la Estación Experimental del INTA de Concordia, Entre Ríos, donde se creó el Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUIS). Este programa tuvo un éxito rotundo en reducir en gran medida la incidencia de las enfermedades transmisibles por injerto en el campo. Consiste en saneamiento mediante un procedimiento de microinjerto y termoterapia que asegurara que sólo yemas libres de patógenos ingresen al mercado cítrico nacional. De esta manera, las yemas a partir de las cuales se realiza la multiplicación del material que luego es plantado en el campo se encuentran libres de toda enfermedad (Costa *et al.*, 2004).

Históricamente, el primer método de diagnóstico desarrollado y aplicado aún hoy es el ya mencionado Indexing Biológico (IB, Roistacher, 1991). Hasta fines del 2022 se



trataba del único método validado para el diagnóstico de psorosis en la Argentina, que será descrito en el Capítulo 3.

Desde el inicio del ensayo de IB hasta la obtención de resultados se demora más de un año. En nuestro país este método de diagnóstico se aplica tanto para el material cuarentenario que ingresa al mercado local como para el monitoreo interno. Sin embargo, en EEUU y la UE el método biológico sólo se aplica sobre material cuarentenario, utilizando métodos moleculares mucho más rápidos y menos costosos para el monitoreo.

Con el transcurso de los años se han desarrollado diferentes métodos inmunológicos aplicados para CPsV en búsqueda de un procedimiento rápido de detección de psorosis. García *et al.*, (1997) desarrollaron un ELISA doble sándwich (DAS-ELISA) para la detección de CPsV. Posteriormente, Alioto (1999) mejoró la detección mediante el desarrollo del ELISA triple sándwich (TAS-ELISA) y en 2006 en nuestro grupo de trabajo se realizaron modificaciones a la técnica (TAS-ELISA-HRP), haciéndola más rápida y sensible (Zanek *et al.*, 2006).

Por otro lado, se avanzó en métodos moleculares de detección de CPsV basados en sus ácidos nucleicos. Se diseñaron varios cebadores para la detección de CPsV mediante RT-PCR como un método alternativo para el diagnóstico (García *et al.*, 1997; Barthe *et al.*, 1998; Legarreta *et al.*, 2000). Actualmente, el TAS-ELISA y la RT-PCR son los métodos más rápidos y confiables para la detección del virus en árboles de campo (Martín *et al.*, 2002a).

También se ha aplicado la PCR cuantitativa (qPCR), ampliamente utilizada para el diagnóstico de muchos agentes patógenos en diversos cultivos, incluyendo las plantas leñosas como los cítricos y otras especies frutales. En varios trabajos han demostrado la fiabilidad de esta herramienta, incluso para la detección simultánea de varios virus en cítricos (Loconsole *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2013; Saponari *et al.*, 2013).

El protocolo de RT-qPCR aplicado en esta tesis fue desarrollado por De Francesco *et al.* (2015) y evaluado en sensibilidad, especificidad y comparado con TAS-ELISA. Utiliza una mezcla comercial de EVA GREEN y cebadores que hibridan en la zona que codifica para la proteína de cubierta viral. De acuerdo a estos resultados el nivel de detección de virus sería igual o mayor al método biológico hasta ahora utilizado. La técnica es capaz de detectar 1000 moléculas de RNA viral, en 100 miligramos de material vegetal, en una relación de 1 copia de RNA viral/100 de ubiquitina, utilizado éste último como gen de referencia por su estabilidad en la planta (Boava *et al.*, 2011)

### 1.3.2.6 Hospedantes experimentales

Si bien en este trabajo de tesis sólo se utilizaron hospedantes cítricos, diversos grupos de trabajo han ensayado plantas herbáceas con el objeto de encontrar hospedantes experimentales para CPsV, incluyendo *Chenopodium quinoa*, *Gomphrena globosa* y varias especies del género *Nicotiana* incluyendo *Nicotiana benthamiana* (Timmer *et al.*, 1978) y *Nicotiana occidentalis*, esta última especie presentando infecciones tanto locales como sistémicas (Robles Luna *et al.*, 2018).

CPsV puede ser transmitido mecánicamente a estos hospedantes partiendo de un extracto de hojas jóvenes de cítrico en un *buffer* adecuado. En *C. quinoa* CPsV causa lesiones locales cloróticas que en 5-7 días post inoculación se vuelven necróticas, sin invadir la planta sistémicamente. En *G. globosa* desarrolla lesiones locales en la zona de inoculación a 10 dpi e infección sistémica a los 20 dpi, presentando lesiones locales en hojas superiores no inoculadas, también en forma de anillos-manchas primeramente cloróticas que luego se van necrosando (da Graca *et al.*, 1991). *N. benthamiana* es un hospedante asintomático; la infección se localiza en la zona de inoculación (Timmer *et al.*, 1978), puede ser detectada por métodos moleculares y no infecta la planta sistémicamente (Reyes *et al.*, 2009).

## 1.4 Objetivo general

Validar y valorar un método molecular de diagnóstico para CPsV, y evaluar la transmisión de CPsV por áfidos y *Olpidium spp.* bajo condiciones controladas.

## 1.5 Objetivos específicos

1. Validar y valorar del método molecular RT-qPCR para el diagnóstico de CPsV
2. Evaluar la transmisión de CPsV por áfidos bajo condiciones controladas.
3. Evaluar la transmisión de CPsV por *Olpidium spp.* bajo condiciones controladas

## 1.6 Hipótesis

1.1 El método de detección de CPsV por RT-qPCR es específico para la detección del agente causal de la enfermedad psorosis de los cítricos.

1.2 El método de detección de CPsV por RT-qPCR tiene una sensibilidad comparable a la del IB para el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos.

2.1 La especie de áfido *Toxoptera citricida* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas

2.2 La especie de áfido *Aphis gossypii* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas.

2.3 La especie de áfido *Aphis spiraecola* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas.

2.4 La especie de áfido *Toxoptera citricida* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

2.5 La especie de áfido *Aphis gossypii* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

2.6 La especie de áfido *Aphis spiraecola* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

3.1 *Olpidium spp.* es capaz de infestar raíces de *Poncirus trifoliata*.

3.2 *Olpidium spp.* es capaz de infestar raíces de *Citrus lemon*.

3.3 *Olpidium spp.* es capaz de infestar raíces del híbrido *Citrus sinensis* L. (naranja dulce Pineapple, NDP).

3.4 *Olpidium spp.* es capaz de infestar raíces del híbrido *Citrangue troyer*.

3.5 *Olpidium spp.* es capaz de adquirir CPsV *in vivo*.

3.6 *Olpidium spp.* es capaz de transmitir CPsV a las raíces de *Poncirus trifoliata*.

# CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS



# 1. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de este trabajo se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), Carlo Erba (Milán, Italia) o Mallinkrodt (New York, EE.UU.). Las drogas y enzimas empleadas en los experimentos de Ingeniería genética fueron de grado Biología Molecular de Sigma (St. Louis, EE.UU.), Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania), Stratagene (La Jolla, EE.UU.), Promega (Madison, EE.UU.), New England Biolabs, NEB (Beverly, EE.UU.), Gibco BRL (Gaithersburg, EE.UU.), PIERCE (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois EE.UU.), Molecular Research center (Cincinnati, EE.UU.), Fermentas (Vilnius, Lituania), BIONEER (USA Bioneer Inc., Alameda, California, Estados Unidos), Invitrogen (Carlsbad, California, EE. UU), Solis BioDyne (Tartu, Estonia), Bio Rad Life Science (Hercules, California, EE. UU.)

# 2. Aislamientos virales

Los ensayos fueron realizados con dos aislamientos distintos de Citrus psorosis virus (CPsV) de origen argentino, tomados de la colección de agentes patógenos de cítricos de la Estación Experimental Agropecuaria (EEA) INTA Concordia (Entre Ríos), mantenidos bajo condiciones de invernadero, a 22-24 C con un fotoperíodo de 16 horas.

Se utilizaron los siguientes aislamientos de CPsV, citrus tristeza virus (CTV), citrus concave gum associated virus (CCGaV) y mirafiori lettuce big-vein virus (MLBVV):

- CPsV 90-1-1, con síntomas típicos de psorosis A, mantenido en Naranja dulce Pineapple (*Citrus sinensis* L. Osb.) y Limón Rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.)
- CPsV 243-7 con síntomas típicos de psorosis B, necrosis y pústulas en hojas maduras y ramas jóvenes.
- CTV 126-13, proveniente del germoplasma de la EEA-INTA Concordia, Entre Ríos

- Un aislamiento de MiLBVV obtenido de la zona hortícola de La Plata
- Aislamientos de citrus concave gum-associated virus (CCGaV) provenientes de los germoplasmas de la EEA-INTA Concordia, Entre Ríos, INIA Salto Grande (Uruguay) e INTA Tucumán.

### 3. Electroforesis en geles de agarosa

Las muestras de DNA, RNA y los fragmentos de amplificación de PCR fueron analizados en geles de agarosa de concentración de 1 % a 3 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos esperados. Para separar y visualizar los fragmentos, la agarosa se disolvió en TAE 0,5X (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM y se agregó bromuro de etidio (BrEt). Las muestras de RNA o DNA se mezclaron en una relación 1:5 con buffer de siembra 6X (buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 50 % (p/v), azul de bromo fenol 1 % (p/v), EDTA 2 mM pH 8,0). Las electroforesis se llevaron a cabo en buffer TAE a voltaje constante, usando 10 V por cada cm lineal de gel. Las bandas correspondientes a RNA o DNA se visualizaron en un transiluminador bajo luz UV.

#### 3.1 Estimación del peso molecular de los productos de PCR

Para estimar los tamaños de los productos de PCR se utilizó el producto 100 bp DNA ladder del manufacturer Invitrogen. Los fragmentos de DNA en este producto se encuentran en la Figura 1:

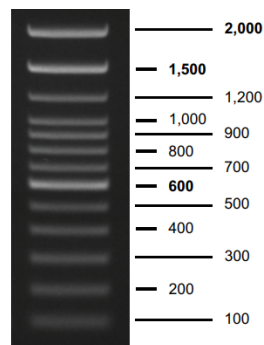


Figura 1: tamaño de los fragmentos de DNA del producto 100bp DNA ladder, en pares de bases.

## 3.2 Purificación de fragmentos DNA a partir de geles de agarosa

El procedimiento utilizado es el que se detalla en el protocolo de BIONEER (USA Bioneer Inc., Alameda, California, Estados Unidos). El segmento de agarosa retirado del gel que contiene la banda de DNA a recuperar se disuelve con 3 volúmenes de Buffer 1 (NaI 6M), calentando a 60°C por 20 minutos. A la agarosa disuelta se le agrega matriz de sílice (glassmilk), se mezcla y se incuba a temperatura ambiente por 5 minutos. Se centrifuga durante 1 minuto a 13000rpm. Se descarta el eluido. Luego la suspensión de sílice se lava y centrifuga 2 veces con Buffer 2 (solución de NaCl, Tris, EDTA, agua y etanol). La columna se seca al aire para eliminar los restos de alcohol y se agrega agua bi-destilada estéril incubando por 2 o 3 minutos a temperatura ambiente, seguida de centrifugación durante 1 minuto a 13000 rpm. El sobrenadante contiene el DNA de interés.

## 4. Extracción y purificación de ácidos nucleicos

### 4.1 Extracción y purificación de RNA total

La extracción de RNA de tejido foliar se realizó con TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente: Se tomaron 100mg de tejido, se colocaron en un tubo de 1,5mL junto con 5 bolillas de vidrio de 2mm de diámetro, luego se sumergieron en nitrógeno líquido durante 60s y se pulverizaron en un homogenizador. Inmediatamente se agregaron 500µL de TRI Reagent® y se mezcló por inversión. Luego de incubar 5min a temperatura ambiente, se agregaron 100µL de cloroformo y las muestras se agitaron vigorosamente durante 15s, para luego ser incubadas nuevamente durante 15min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 12000xg y 4°C durante 15min y la fase acuosa fue colocada en un nuevo tubo de 1,5mL donde se añadieron 250µL de isopropanol y mezcló por inversión. Luego de una incubación de 10 min a temperatura ambiente se centrifugaron a 12000xg y 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó la pelotilla con 500µL de etanol 75%v/v. Luego de dejar secar las muestras durante 10 minutos al aire en un ambiente estéril, se resuspendió la pelotilla en 20µL de agua libre de nucleasas.



Para el caso de las extracciones de RNA total de áfidos, se realizó un homogenado de 100 uL de TRI Reagent® y 5 adultos o bien 10 ninfas en tubos plásticos de 1,5 mL con pilón. El procedimiento de extracción se realizó de la manera ya descrita manteniendo los volúmenes especificados en el párrafo anterior.

Se evaluó la integridad del RNA mediante observación en gel de agarosa 1% y tinción con bromuro de etidio. Se visualizan dos bandas predominantes de RNA ribosomal pequeño (2 kpb) y grande (5kb), RNA de bajo peso molecular (0,1-0,3 kpb) y bandas discretas de alto peso molecular (7-15 kpb). La ausencia de RNA ribosomal indica que la muestra se encuentra degradada.

La concentración del RNA purificado se midió por Absorbancia a 260nm utilizando Espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer), o bien por estimación visual en función de la intensidad de las bandas de 2 y 5 kpb (Figura 2).

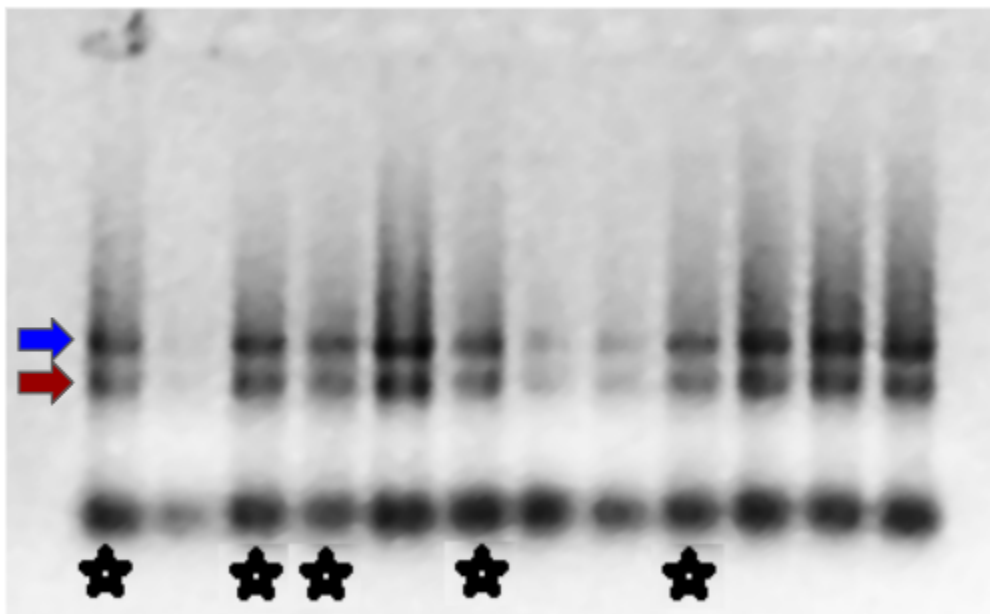


Figura 2: Visualización de la integridad de RNA en extracciones de RNA total. En las calles marcadas con una estrella la muestra correspondiente tiene una concentración aproximada de 1µg/µL. La flecha roja señala la banda de RNA ribosomal de 2 kpb, la flecha azul señala la banda de RNA ribosomal 5 kpb.

## 4.2 Extracción y purificación de DNA total

La extracción de DNA de tejido foliar y concentrado de zoosporas se realizó con una solución 1% p/v CTAB, 50 mM Tris HCl pH 8, 700 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% PVP 8000 y 0,1% v/v 2ME. Brevemente, se homogenizó el sedimento concentrado de zoosporas o bien 100 mg de material vegetal molido con 400 uL de solución de extracción y se incubó a 60 °C durante 60 minutos. Se agregó 400 uL de cloroformo, agitó hasta homogenizar para luego separar las fases por centrifugación a 14000 xG durante 5 minutos. Se tomó la fase acuosa, se mezcló junto con el mismo volumen de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 15 minutos. Luego se precipitó el DNA mediante centrifugación a 14000 xG por 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiró el isopropanol y se realizaron dos lavados con etanol 70%. El sedimento de DNA se secó al aire y resuspendió en 20 uL de agua estéril libre de nucleasas.

## 5. Reacciones enzimáticas

### 5.1 Digestión con DNAsa

Se trataron con DNAsa aquellas muestras de RNA que luego son analizadas por RTqPCR (para cuantificar únicamente los mensajeros con identidad de secuencia, evitando contaminaciones con DNA). Se digirió 1 µg de RNA molde con 1 unidad de DNAsa (RQ1 RNase-Free DNase, Promega) en las condiciones especificadas. La reacción se detuvo incubando a 65°C durante 10 minutos con 1 µl de RQ1 stop solution.

### 5.2 Síntesis de cDNA (transcripción reversa, RT)

Para sintetizar cDNA se añadieron los cebadores hpCP1C, hpCP3, Ubqt2 y Ubqt1 (10µM) a 2,5µL de RNA tratado con DNAsa junto con 2,4uL de agua libre de nucleasas para un volumen final de 6,9µL. Luego de una incubación de 5min a 80°C se agregaron 2,5µL del buffer de la M-MLV Reverse Transcriptase, 2,5µL de dNTPs (10µM), 0,1µL de Ribonuclease inhibitor y 0,5µL de M-MLV y se incubó nuevamente durante 60min a 42°C seguido de 15min a 70°C.

### 5.3 Reacción de PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR se realizaron en un ciclador Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER). Para un volumen de reacción de 10  $\mu$ l se agregaron 1  $\mu$ l de buffer de Taq DNA polimerasa (50mM KCl; 10 mM Tris-HCl pH 9.0; 0,1% v/v Tritón X-100), 0,2  $\mu$ l dNTPs (10 mM de cada uno), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, los cebadores directo y reverso a una concentración final 1  $\mu$ M y 0,25 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen). Las condiciones generales de ciclado fueron de 5 minutos a 94°C como etapa inicial de desnaturalización, 36 ciclos de 10" a 94°C, 30" a la temperatura de apareamiento de cada par de cebadores y 50" (este tiempo varía de acuerdo a la extensión del fragmento a amplificar) a 72°C y una etapa de elongación final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa de una concentración de entre 1 y 2% (según el tamaño del amplicón a resolver), en buffer TAE 1X y en presencia de bromuro de etidio.

### 5.5 Reacción de PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Las cuantificaciones de RNA mensajero por RT-qPCR (previo tratamiento con DNAsa y síntesis del cDNA) se llevaron a cabo en un ciclador Fluorescent Quantitative Detection System FQD- 48A (BIOER). Las mezclas de reacción tuvieron un volumen final de 25  $\mu$ l y 100ng de molde, cuando se utilizó IQSybr Green Super mix (Bio Rad); o 20  $\mu$ l de volumen de reacción y 40ng de molde si se utilizó 5X HOT FIREPol® EvaGreen® qPCRMix Plus no ROX (Solis BioDyne). Se utilizaron los buffers y condiciones de reacción especificados por cada fabricante. En ambos casos se utilizaron los cebadores directo y reverso a una concentración a una concentración final 200nM. Las condiciones de ciclado en todos los casos fueron de 5 minutos a 95°C como etapa inicial de desnaturalización, 50 ciclos de 20" a 95°C, 30" a 56°C y 20" a 72°C y una etapa de elongación final de 5 minutos a 65°C. Finalmente se realizaron las correspondientes curvas de melting (fusión) en el rango de temperatura de 72-93°C. Las curvas de calibración para la cuantificación absoluta fueron generadas a partir de diluciones seriadas de los amplicones purificados y cuantificados. La concentración de los estándares utilizados en la curva de calibración fue calculada a partir de su absorbancia a 260nm y expresadas en número de copias del amplicón por unidad de volumen.

## 6. Inoculación viral mediante injerto

El injerto se realiza haciendo un corte en forma de T-invertida en la corteza de un plantín de naranjo dulce Pineapple (NDP) e insertando un trozo de corteza proveniente de un plantín infectado con el aislamiento de CPsV especificado, alineando el tejido vascular. La planta es podada inmediatamente después de la inoculación por injerto. El proceso se encuentra esquematizado en la Figura 3:

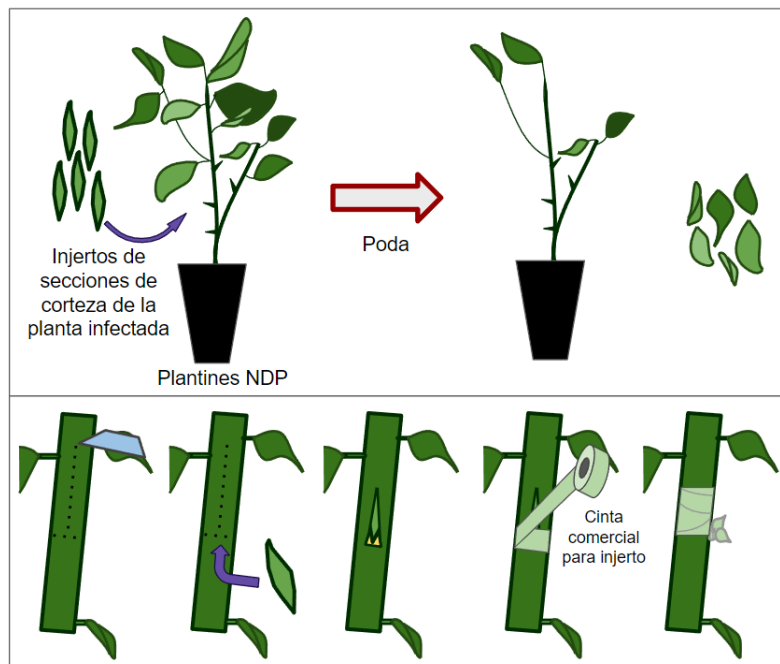


Figura 3: Esquema del procedimiento de inoculación de plantines sensibles a CPsV. Arriba: Las secciones de corteza provenientes de la planta infectada se injertan en plantines de NDP y son simultáneamente podados para estimular su brotación. Abajo: Procedimiento para el injerto: se hace un corte en “T” en la corteza del plantín NDP y se la despega del tallo, dejando espacio donde se introduce la corteza de la planta infectada. La unión se fija y protege envolviéndola con cinta comercial para injerto.

## 7. Concentración de zoosporas a partir de raíz de cítrico

Protocolo modificado de Herrera-Vásquez *et al.* (2009).

Para la extracción y concentración de esporangios de *Olpidium* spp. se tomaron plantas mantenidas en invernáculo de al menos un año de edad, se retiraron de sus macetas y se quitó la mayor cantidad de sustrato posible sin dañar la planta. Luego se recortaron entre el 30 y el 50 % de las raíces que se encontraban en activo crecimiento. Se colocaron entre 15 y 50 g de este material en tubos falcon de 50mL conteniendo una solución de glicina (0.05M) y sacarosa (1% p/v) (solución GLISAC). Los tubos se mantuvieron a 4°C y en agitación a 70 rpm durante 8-12 horas para estimular la liberación de zoosporas al medio acuoso.

Posteriormente se retiraron las raíces y se realizaron 1 ó 2 centrifugaciones a 2000 xg durante 5 minutos, dependiendo del aspecto del sobrenadante (turbidez y color). El sobrenadante contiene zoosporas, restos de tejido y de células en suspensión mientras que el sedimento, que es descartado, contiene fragmentos de raíz y tierra que se desprendió de ellas debido a la agitación. Para concentrar las zoosporas el sobrenadante fue centrifugado a 7200 xg durante 3 horas. El proceso se encuentra esquematizado en la Figura 4:

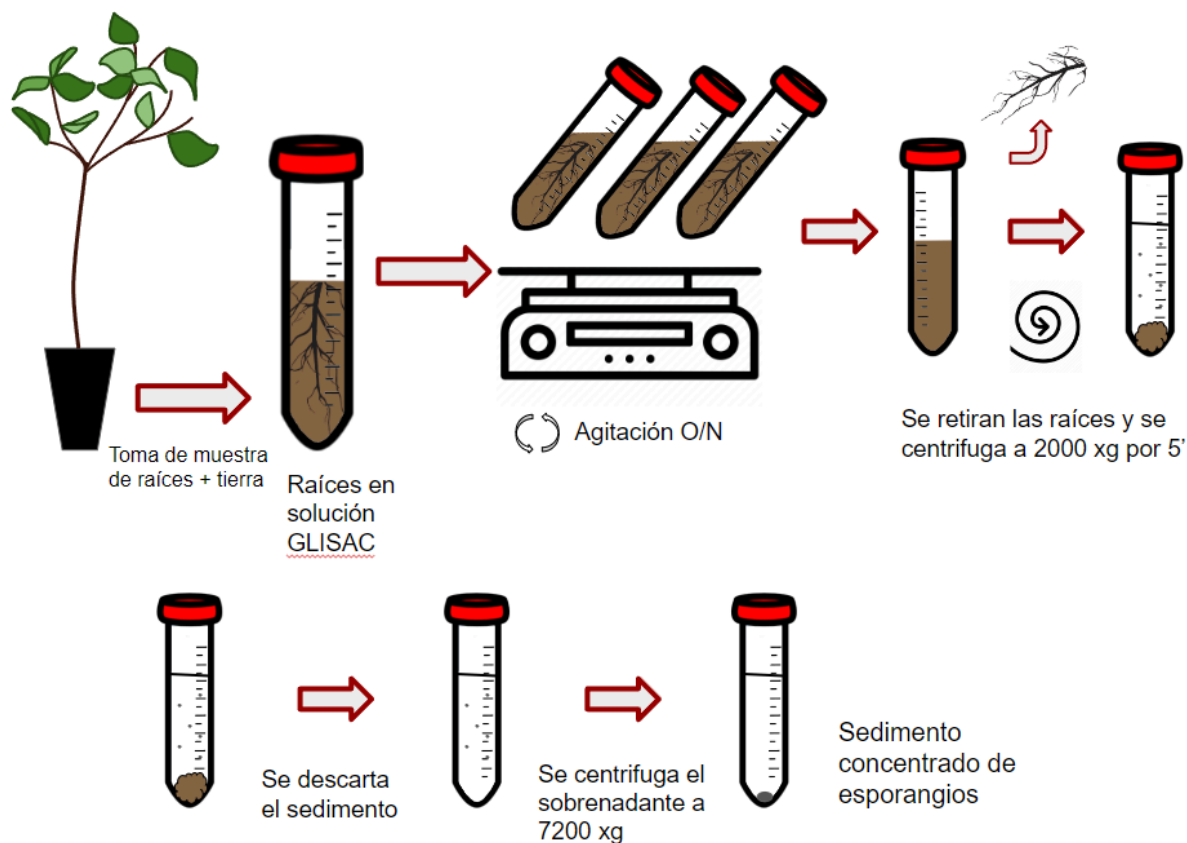


Figura 4: Esquema del procedimiento aplicado para la extracción y concentración de zoosporas.

## 8. Origen de muestras vegetales

Las muestras utilizadas en esta tesis se originaron en el NOA, NEA y en la región de Salto Grande, Uruguay. Fueron provistas por la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEOC), Tucumán, Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUIS) INTA Concordia, Entre Ríos, y la Estación Experimental INIA Salto Grande, Uruguay, respectivamente, y fueron colectadas a lo largo de 4 años (período 2016-2019).

Las especies incluidas fueron: *Citrus sinensis*, *Poncirus trifoliata*, *C. sinensis* x *P. trifoliata*, *Citrus clementina*, *Citrus paradisi*, *Citrus limon* y *Citrus reticulata* x *C. sinensis*.

## 9. Ensayo biológico para el diagnóstico de psorosis de los cítricos: IB

Para el diagnóstico por ensayo o *Indexing* Biológico (IB) se dividieron las copas de los árboles a analizar (“planta candidata”) en cuatro secciones correspondientes a los cuatro puntos cardinales y se tomaron varetas de cada uno de éstos.

Para el diagnóstico de las plantas denominadas “candidatas” se tomaron las varetas correspondientes a cada una y con ellas se inocularon 4 plantines jóvenes de NDP, injertando en cada plantín material proveniente de los cuatro puntos cardinales de la copa de planta candidata. Inmediatamente después de la inoculación los plantines fueron podados para estimular la producción de hojas nuevas, donde se pueden observar fácilmente los síntomas causados por las enfermedades del “grupo psorosis” en caso de que la planta candidata estuviera infectada.

La observación de síntomas se realiza de 30 a 45 días después de la inoculación en brotes jóvenes, que es donde mejor se visualizan. Luego de cada observación los plantines son podados nuevamente para generar nuevos brotes. Se realizan 5 observaciones sucesivas (“brotaciones” o “*flushes*”) y por último, se confirma la presencia de CPsV (aislamiento PsA) antes de finalizar el proceso con un ensayo de protección cruzada. Para esto se inoculan 2 de los 4 plantines con un aislamiento agresivo de PsB. Como ya se mencionó, la PsB produce síntomas más severos que la PsA, pero en los casos en los que los plantines se encuentran infectados (protegidos) con PsA, no se observará desarrollo de síntomas de PsB.

El diagnóstico se informa una vez finalizado todo el proceso, incluyendo el ensayo de protección cruzada, lo que demora hasta un año. Este proceso se encuentra esquematizado en la Figura 5.

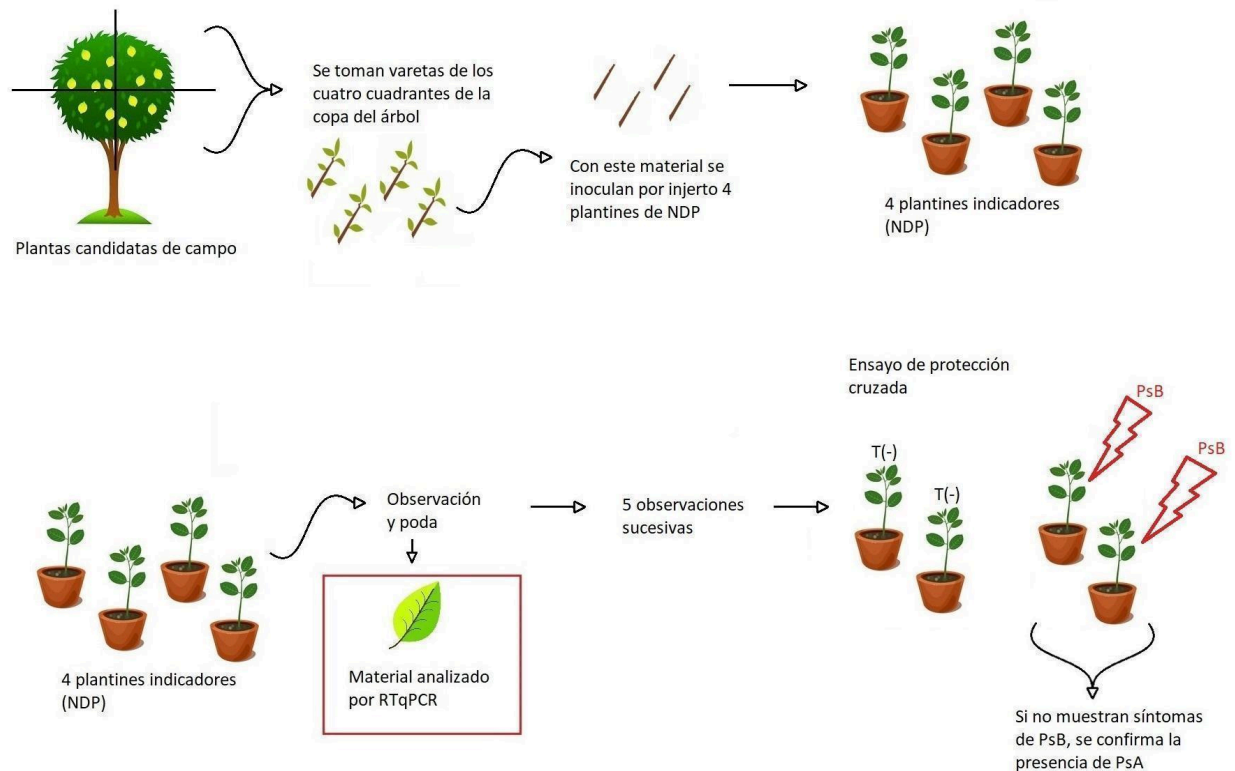


Figura 5: Esquema del procedimiento llevado a cabo para el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos por indexing biológico (IB).

## 10. Análisis estadístico

Para la comparación de los resultados obtenidos entre técnicas se consideró al resultado del IB como verdadero estado sanitario de la planta candidata. De esta manera se calcularon la sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) para la RT-qPCR.

Se es la proporción de verdaderos positivos correctamente identificados por el método, mientras que Sp es la proporción de verdaderos negativos correctamente identificados. Luego se calcularon los likelihood ratios (LR + y LR -), donde LR + es la relación  $Se/(1 - Sp)$  y LR - se define como  $(1 - Se)/Sp$  (Altman, 2000). Estos estadísticos son



relaciones de probabilidad y por lo tanto pueden adoptar valores mayores a 1. Para todos los cálculos se establecieron límites de confianza binomiales al 95%.

La concordancia entre métodos fue evaluada utilizando el índice Kappa de Cohen (Cohen 1960), que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada para elementos clasificados en variables categóricas (en este caso, planta sana/planta infectada) y es más estricto que el porcentaje de concordancia. Este coeficiente fue categorizado utilizando los límites de Landis y Koch (Landis & Koch 1977).

Se evaluó la presencia de sesgo utilizando el test de McNemar  $\chi^2$ , donde un resultado no significativo indica que no hay evidencia de un efecto sistemático, y se calculó el índice Kappa ajustado por prevalencia y sesgo (prevalence-adjusted, bias-adjusted Kappa index, PABAK). Todos los cálculos fueron realizados utilizando R language (R Core Team, 2019) y Rstudio (Rstudio Team, 2018) a menos que se indique lo contrario.

# 11. Cebadores

Nombre	Secuencia nucleotídica	Amplicón correspondiente a:
HPCP1C	GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGGA	RNA 3 citrus psorosis virus
HPCP3	GAGACCCTTGTGTAAAAACCAGCAC	RNA 3 citrus psorosis virus
Ubqt2	GCGTCCTTCCATCCTCCAGC	Gen ubiquitina de <i>Citrus sinensis</i>
Ubqt1	CACCTCGTGCTTCGTCTCCG	Gen ubiquitina de <i>Citrus sinensis</i>
EF-1 $\alpha$ .F	GATGCACCTGGTCACAGAGA	Gen factor de elongación 1-alfa de <i>Toxoptera citricida</i>
EF-1 $\alpha$ .R	CCATCTTGTTACACCAACG	Gen factor de elongación 1-alfa de <i>Toxoptera citricida</i>
Cs gadph rv	tctaagcacaaccctgcatgag	Gen GADPH de <i>C. sinensis</i>
Cs gadph fw	tgtgtttctatgtagagggtctgagttt	Gen GADPH de <i>C. sinensis</i>
Cs actin l	ccaagcagcatgaagattaagg	Gen actina de <i>C. sinensis</i>
Cs actin r	cgctcactactcagaccagg	Gen actina de <i>C. sinensis</i>
OLPR	TCCTCCGCTTATTGATATGCTTA	Secuencia ITS de <i>Olpidium spp.</i>
OLPborF	CCGAGGAAATGAGAGAGATGACA	Secuencia ITS de <i>Olpidium bornovanus</i>
OLPvirF	AACCCAAGACCTGCCCCAAAAG	Secuencia ITS de <i>Olpidium virulentus</i>
OLPbraF	AGCTATAGCTCACCTCTTT	Secuencia ITS de <i>Olpidium brassicae</i>
CGFW	TAAGATCGCTAATCATTAATCAGAG	RNA 2 citrus concave gum-associated virus
CGRV	CTGTCACTATGTCCAGAAGGAAC	RNA 2 citrus concave gum-associated virus

## 11.1 Detección diferencial para *Olpidium virulentus*, *bornovanus* y *brassicae*

Para la detección de *Olpidium* spp. y la distinción entre *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus* se utilizó el juego de cebadores diseñado por Herrera-Vásquez *et al.* (2009). Se trata de 4 cebadores, uno común para el sentido reverso, y 3 cebadores distintos específicos para las tres especies a diferenciar. Los productos de cada par de cebadores presentan distintos tamaños: *O. bornovanus* produce un fragmento de 977 pb, *O. virulentus* uno de 579 pb y *O. brassicae* uno de 204 pb. A continuación en la Figura 6 se esquematiza la ubicación de cada cebador dentro del ITS sobre el cual fueron diseñados y en la Figura 7 se muestra el producto de la electroforesis en gel con el tamaño esperado para cada especie:



Figura 6: Esquema del sitio de hibridación de cada cebador para la identificación de *Olpidium* spp. y la diferenciación entre *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus*.

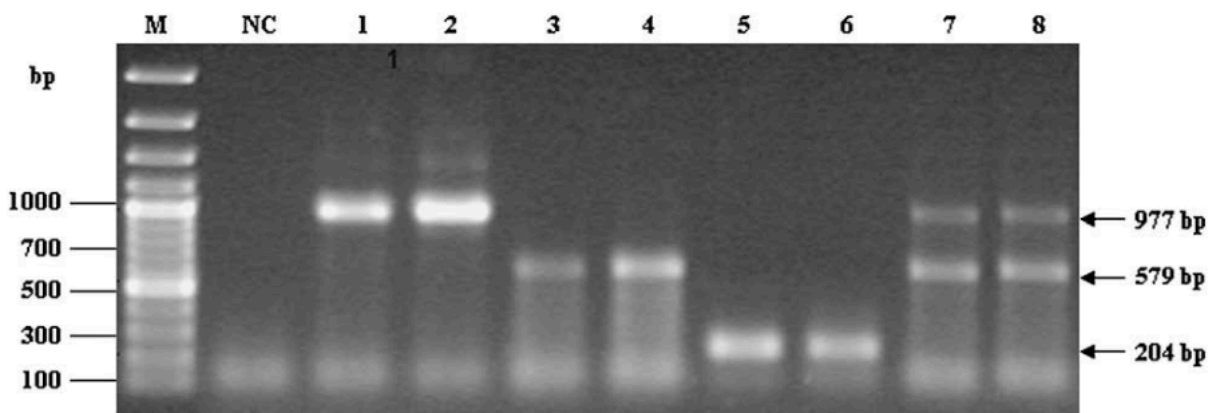


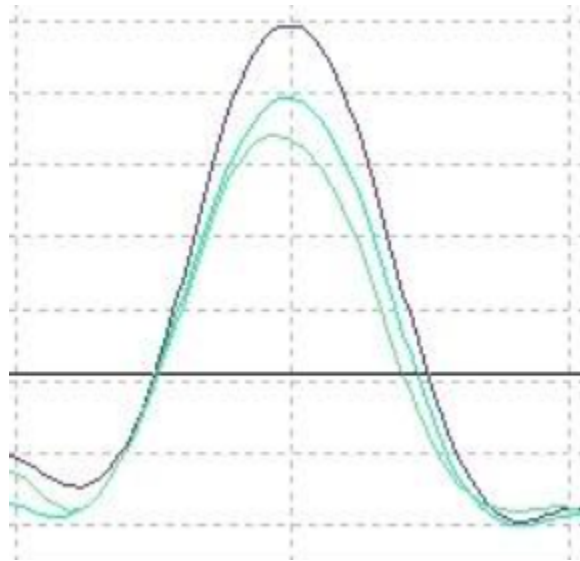
Figura 7: Amplificación por PCR multiplex de tres especies de *Olpidium* spp. Calles 1 y 2: *O. bornovanus* (fragmento de 977 pares de bases), calles 3 y 4: *O. virulentus* (fragmento de 579 pares de bases), calles 5 y 6: *O. brassicae* (fragmento de 204 pares de bases), calles 7 y 8: infección dual de *O. bornovanus* y *O. virulentus*, calle NC: control negativo con agua, calle M:

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania). Tomado de Herrera-Vásquez *et al.*, (2009).

## 12. Secuenciación

Todas las determinaciones de secuencia nucleotídica fueron realizadas usando el servicio de la empresa MACROGEN (<https://dna.macrogen.com/>) mediante secuenciación por electroforesis capilar.

# CAPÍTULO 3: DETECCIÓN DE CPsV POR RT-qPCR



## 3.1 Introducción

El diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos en la Argentina se realiza mediante ensayo biológico o *indexing* biológico (de aquí en adelante, IB) desde el desarrollo del test en 1991 por Chester Roistacher (Roistacher, 1991). A continuación se describe la metodología de este ensayo, su especificidad y la necesidad de contar con un método alternativo más rápido y menos costoso.

### 3.1.1 Indexing Biológico para el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos

El diagnóstico de psorosis mediante IB comienza con la inoculación de plantines sanos susceptibles a psorosis (plantas indicadoras) utilizando material vegetal proveniente de la planta de estado sanitario desconocido (planta candidata).

Se definen 4 cuadrantes en la copa de la planta candidata correspondiente a los 4 puntos cardinales y se toman muestras de varetas o ramas jóvenes de cada uno de ellos. La toma de muestras se realiza de esta manera para evitar falsos negativos debido a la distribución heterogénea de CPsV dentro de la planta infectada. Las especies del género *Citrus* usados como indicadores manifiestan síntomas foliares con claridad en brotes jóvenes que se hayan manifestado después de la inoculación. Se utilizan las variedades de naranjo dulce Pineapple (NDP), Olivelihoods o Madame Vinous (Roistacher, 1993). Los plantines se injertan y se podan al mismo tiempo, y las observaciones de síntomas se realizan en los brotes jóvenes desarrollados a los 20-30 días post inoculación. El material proveniente de plantas candidatas infectadas causa el desarrollo de *flecking* y *shock* necrótico en los brotes jóvenes de los plantines indicadores. El procedimiento se encuentra esquematizado en la Figura 1.

Luego de 5 lecturas de síntomas (en 5 brotaciones sucesivas) y como segunda etapa, del IB, se realiza un ensayo de protección cruzada con un aislamiento de PsB para confirmar la infección por PsA. Las plantas indicadoras que hubieran sido inoculadas con material de plantas candidatas infectadas con PsA no desarrollarán síntomas de PsB. Aquellas plantas indicadoras inoculadas con material proveniente de plantas candidatas libres de PsA sí desarrollarán síntomas de PsB como pústulas y descascaramiento de la corteza de las ramas jóvenes.

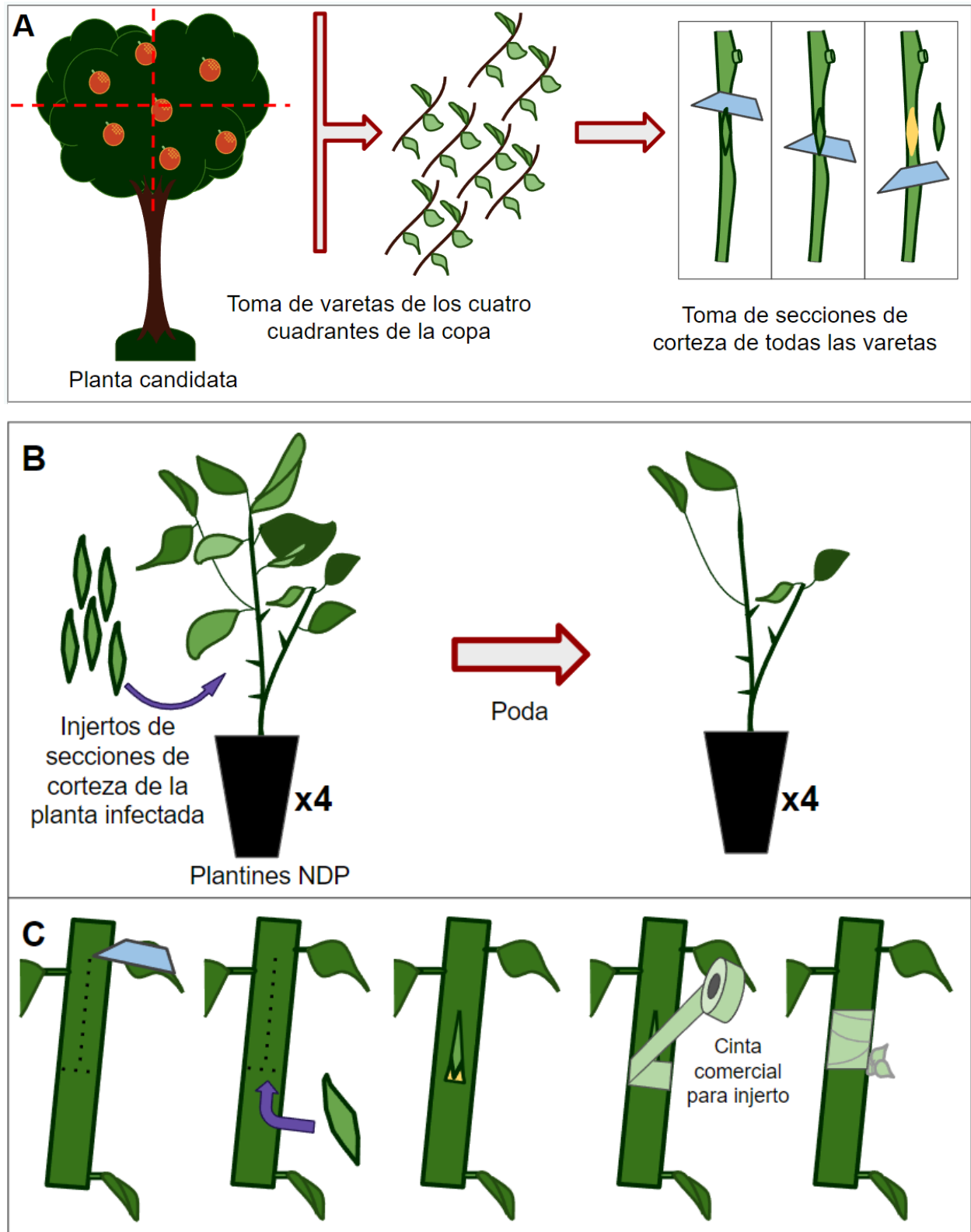


Figura 1: Esquema del procedimiento de inoculación de plantines indicadores. (A) La copa de la planta candidata es dividida en 4 cuadrantes de donde se toman ramas jóvenes (varetas). De éstas

se toman secciones de corteza de partes que no presenten nudos. (B) Las secciones de corteza se injertan en 4 plantines indicadores NDP, y son podados simultáneamente para estimular su brotación. La observación de síntomas se realiza en los nuevos brotes y hojas jóvenes. La observación y poda se repite 5 veces a lo largo del ensayo, cada 30-45 días. (C) Procedimiento para el injerto: se hace un corte en “T” en la corteza del plantín indicador y se la despega del tallo, dejando espacio donde se introduce la corteza de los diferentes cuadrantes proveniente de la planta candidata, alineando los tejidos vasculares de cada planta. La unión se fija y protege envolviéndola con cinta comercial para injerto.

En el caso de que las plantas indicadoras hubieran dado síntomas de flecking y manchas, pero no hubieran protegido contra PsB, se puede sospechar de otra enfermedad del grupo psorosis que también causa sintomatología similar (ver más adelante). El IB demora más de un año en arrojar resultados y tiene un costo elevado debido a que es necesario mantener un gran número de plantas (cuatro veces la cantidad de plantas candidatas a evaluar) en un invernáculo bajo condiciones controladas y con personal técnico especializado que prepare el material para el ensayo y realice la lectura de síntomas.

### 3.1.2 Control de la enfermedad

A partir del año 1994 se implementó en nuestro país el Programa de Mejoramiento Varietal y Sanitario en Citrus (PROCITRUS) impulsado por el Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUIS) en la estación INTA Concordia en Entre Ríos (PROCITRUS INTA Concordia, 2017). Aplicando este programa se redujo considerablemente la incidencia de psorosis en las regiones productivas del país (Anderson, 2000) aunque aún se pueden encontrar árboles afectados en el NEA y NOA (Zanek *et al.*, 2006; Claudio Gómez, comunicación personal), principalmente en árboles de más de 20 años de edad.

Actualmente en la Argentina la normativa vigente (Resolución 811/04, modificación de los Anexos I, II, III y IV de la Resolución N° 149/98 de la ex-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, referida a las Normas para la Producción, Comercialización e Introducción de Plantas Cítricas de Vivero y sus Partes) incluye técnicas moleculares para la detección de multitud de patógenos (virus de la tristeza de los cítricos, exocortis, clorosis variegada, entre otros). Comparando esta normativa con la aplicada en otros países, tanto en la Unión Europea como en EEUU se utilizan métodos biológicos y moleculares dependiendo de la procedencia de la muestra a



analizar. En la UE, la normativa *Pathogen Tested Citrus Trees and Roostocks* (EPPO Standards) indica que para virus pertenecientes al “grupo psorosis” se aplican ensayos biológicos sólo dentro de la normativa de cuarentena. En EEUU se aplica el mismo criterio, utilizando el test biológico para evaluar plantas de estado sanitario desconocido antes de ser introducidas al país, aplicando al mismo tiempo un método molecular y manteniendo dichas plantas en cuarentena.

La normativa actual vigente en nuestro país se aplica a todo tipo de material por igual: plantas madres yemeras, plantas madres semilleras, re-testeo de plantas madre semilleras, plantas madre certificadas, plantas madre saneadas, plantas candidatas para ingresar al país y para ser exportadas. De esta manera, la normativa coincide con la europea y estadounidense para los casos de introducción de material nuevo al país. Los re-testeos son realizados sobre material vegetal ya saneado y certificado y tanto en la UE como en EEUU se realizan aplicando métodos moleculares o serológicos, mientras que en la Argentina se sigue aplicando el ensayo biológico.

En Argentina la resolución 275 del Instituto Nacional de Semillas (INASE) que es la normativa vigente indica que todas las plantas de las cuales se producen semillas (Plantas Madres Semilleras, PMS) de *P. trifoliata* y todos los híbridos *Citrange* deben ser analizadas cada 6 años, a pesar de no haber evidencia de la transmisión de la enfermedad por semilla (Roistacher, 1993).

En la región del NOA, en el Centro de Saneamiento de Citrus de la EEAOC, ciudad de Tucumán, se han realizado hasta el momento 1324 diagnósticos mediante IB, de los cuales 271 corresponden a re-testeos que se realizan periódicamente (cada 4 ó 6 años) a plantas utilizadas como fuente de material vegetal (varetas o semillas). De estos 1324 diagnósticos solamente nueve plantas (0,89% del total de plantas analizadas) resultaron positivas, pero ninguna de ellas fue confirmada como PsA mediante el ensayo de protección cruzada. Esto demuestra que se trataba de plantas infectadas con un patógeno capaz de producir síntomas similares a los producidos por CPsV (*flecking* y *shock* necrótico) en plantas indicadoras, pero que no se trataba de CPsV. Sólo mediante análisis molecular sería posible identificar el o los patógenos presentes en las nueve plantas identificadas como enfermas.

En la región del NEA, en EEA INTA Concordia durante el período 2005-2020 se han llevado a cabo 15 campañas de diagnóstico en las que se analizaron en total 838 muestras, que incluyen 436 Plantas Madres Semilleras y 402 re-testeos de Plantas Madres Semilleras. En total se registraron 12 positivos (correspondiente a 1,43% de las muestras analizadas). El 89,7% de ellas eran provenientes del NEA y produjeron síntomas de *flecking* y manchas cloróticas en plantines indicadores. Para todas las

plantas positivas se confirmó el diagnóstico de PsA mediante el ensayo de protección cruzada. A diferencia de lo encontrado en el NOA, en el NEA se confirmó la presencia de PsA, pero esto no descarta la posibilidad de que existan infecciones mixtas en alguno de estos resultados positivos.

Como la normativa vigente exige a los productores el testeo periódico de Plantas Madres Semilleras, en las estaciones experimentales del país se realiza un alto número de re-testeos (402 de 838 ensayos totales en el NEA y 271 de 1324 en el NOA) mediante el IB, lo que limita tanto la cantidad de plantas que pueden ser evaluadas para su ingreso al mercado como también la frecuencia con la que se pueden realizar estos re-testeos.

En base a estas limitaciones y sin aplicar un análisis que identifique al patógeno, contar con un método de diagnóstico molecular para la detección de CPsV permitiría analizar mucho más rápido el estado sanitario tanto de plantas candidatas que ingresen al mercado como de PMS. Esto no sólo aceleraría la obtención de resultados, sino que además permitiría el análisis de un número mucho mayor de plantas y reduciría los costos de diagnóstico ya que no sería necesario utilizar y mantener 4 plantines indicadores por cada planta a evaluar durante el año que demora el IB en arrojar resultados.

En 1997 García *et al.* y luego Legarreta *et al.*, (2000) desarrollaron un protocolo de RT-PCR para la detección de CPsV. A partir de este trabajo diversos grupos en distintos laboratorios aplicaron esta metodología. En 1998, D'Onghia *et al.* reportan buena correlación entre los resultados del IB y el protocolo DAS-ELISA desarrollado por García *et al.* (1997). Posteriormente, en el IVIA, Valencia, España, Martín *et al.*, (2005) obtuvieron anticuerpos poli y monoclonales contra la proteína de cubierta de CPsV desarrollando un ELISA y comparan varios métodos de detección incluyendo la técnica de TAS-ELISA y RT-PCR. Luego en nuestro laboratorio, Zaneck *et al.*, (2006) desarrolla la técnica TAS-ELISA con mayor nivel de detección. Esta técnica no pudo ser incluida en este trabajo de tesis ya que se agotaron los anticuerpos. En 2010 Loconsole *et al.* y posteriormente Saponari *et al.*, (2013) reportan avances sobre la técnica de RT-qPCR y demuestran la detección de CPsV entre otros virus, pero sin comparar los parámetros de diagnóstico del método con el tradicional IB, limitando la confianza en su aplicación. En 2015 De Francesco *et al.* diseñan cebadores específicos que hibridan sobre la secuencia de la proteína de cubierta de CPsV en una región muy conservada en distintos aislamientos cuya secuencia se encontraban disponibles. Además compara la detección por RT-PCR con el TAS-ELISA encontrando que aquélla es más sensible que ésta por un factor de tres órdenes de magnitud.

Son muy pocos los trabajos publicados en los que los métodos moleculares de detección hayan sido evaluados y valorados para el diagnóstico de una enfermedad causada por virus. Entre ellos se encuentra el trabajo de Vidal *et al.* (2012) donde se calcularon parámetros de diagnóstico de dos métodos moleculares (RT-PCR en tiempo real y ELISA) para la detección de citrus tristeza virus (CTV) evaluando su utilidad como herramientas de diagnóstico, comparándolos con el IB tradicional y sugiriendo éste estudio como un modelo a seguir para otros patógenos vegetales.

Tomando este ejemplo como modelo nuestro objetivo fue evaluar y validar la RT-qPCR ya desarrollada por De Francesco como método de detección de CPsV, comparándola con el IB e incorporar esta metodología a la normativa argentina vigente para el diagnóstico de la enfermedad psorosis, disminuyendo tiempos y costos en los análisis.

### 3.1.3 Enfermedades del “grupo psorosis”

Como se mencionó en la introducción general se llama “grupo psorosis” a un conjunto de enfermedades que afectan a los cítricos y producen *flecking* en hojas jóvenes de plantines indicadores. Estas enfermedades son citrus ringspot, concave gum, impietratura, cristacortis y psorosis de los cítricos.

En 2018, Navarro *et al.* encontraron mediante secuenciación masiva y análisis bioinformático un virus a RNA negativo asociado a la enfermedad Concave Gum y diseñaron un protocolo de RT-PCR para su detección (Navarro *et al.*, 2018a). Como ya se mencionó en la introducción general, la enfermedad concave gum produce síntomas de *flecking* en plantines indicadores al inocularlos con corteza proveniente de una planta infectada, al igual que CPsV.

A partir del mismo análisis este grupo de trabajo logró identificar un segundo virus a RNA negativo asociado a la enfermedad cristacortis o impietratura, denominado citrus virus A (CiVA) y desarrollaron un protocolo de RT-PCR para su detección (Navarro *et al.*, 2018b). La asociación entre CiVA e impietratura se vio reforzada gracias al trabajo de Beris *et al.* en 2021 y en 2022 De Bruyn *et al.* desarrollaron un método de RT-PCR real time para su detección en cítricos.

Las técnicas de detección específicas desarrolladas permiten identificar a cada uno de estos agentes causales, algo que hasta el momento no era posible mediante la técnica

de diagnóstico por IB. Por otro lado, la identificación de cada uno de estos virus permite conocer su incidencia en las diversas regiones productoras de cítricos, lo que a su vez permite un mejor monitoreo del estado de los campos de cítricos que se encuentran en actividad productiva.

Para la comparación entre el IB y la técnica específica de RTqPCR desarrollada por De Francesco *et al.* (2015) se contó con material foliar proveniente tanto del NOA como del NEA y de la región de Salto Grande, Uruguay. Esto incluye tanto material foliar de plantas adultas de colección ya evaluadas por IB como material foliar joven proveniente de los ensayos de IB de campañas de certificación llevadas a cabo en el INTA Concordia entre los años 2017-2020. Estas muestras podrían presentar tanto CPsV como alguno (o algunos) de los virus que causan las otras enfermedades del “grupo psorosis”. Como parte de este trabajo de diagnóstico de CPsV se presentó la oportunidad de utilizar los cebadores diseñados por la Dra. Mari Carmen Vives para la detección de CCGaV para evaluar su presencia en Argentina (Dra. Mari Carmen Vives, IVIA, España, comunicación personal).

En base a todos estos antecedentes se plantearon los siguientes objetivos.

## 3.2 Objetivos

3.2.1 Validar y valorar mediante parámetros estadísticos el método de detección de CPsV por RT-qPCR comparando los resultados de esta técnica con el IB tradicional.

3.2.2 Proponer la incorporación del método de detección de CPsV por RT-qPCR como método de diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos en la normativa argentina.

3.2.3 Determinar la presencia de CCGaV en Argentina y Uruguay aplicando la técnica de RT-PCR.

## 3.3 Hipótesis

3.3.1 El método de detección de CPsV por RT-qPCR es específico para la detección del agente causal de la enfermedad psorosis de los cítricos.

3.3.2 El método de detección de CPsV por RT-qPCR tiene una sensibilidad comparable a la del IB para el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos.

3.3.3. CCGaV está presente en las regiones del NOA y NEA.

## 3.4 Resultados

### 3.4.1 Criterio de selección de las muestras a analizar

Se contó con el material de poda de las primeras tres brotaciones de las campañas de certificación llevadas a cabo por el Ing. Claudio Gómez y su equipo en el CUIS - INTA, Concordia, Entre Ríos (NEA) correspondientes a las campañas 2017/2018 (muestras recibidas en el INTA en 2017, resultados informados en 2018), campañas 2018/2019 (muestras recibidas en 2018, resultados informados en 2019) y 2019/2020 (muestras recibidas en 2019, resultados informados en 2020), lo que permitió realizar la comparación de los resultados de dichas campañas con los obtenidos mediante el análisis por RT-qPCR. Se trata de material vegetal (hojas jóvenes) sobre el cual se realizó la observación de síntomas para el análisis por IB, correspondientes a la variedad naranjo dulce Pineapple (NDP) de 6 a 12 meses de edad. Este grupo de muestras se denominó “plantines indicadores”. Las plantas evaluadas mediante observación de los “plantines indicadores” se denominan “plantas candidatas” (Figura 2).

Si bien la técnica de diagnóstico de psorosis por IB se ha llevado a cabo en 5 observaciones y podas de los plantines indicadores, en este trabajo se analizó solamente el material proveniente de las primeras 3 observaciones. Esta decisión se tomó en base a que en todas las campañas realizadas en la EEA INTA Concordia a lo largo de 15 años el 100% de las muestras positivas manifestaron los síntomas sólo en los plantines indicadores de la segunda y tercera brotación (Ing. Claudio Gómez, comunicación personal).

Además se analizó material foliar de 37 plantas adultas de colección del NOA ya evaluadas por IB previamente en la Estación Experimental Obispo Colombres de Tucumán (cedido por la Dra. Beatriz Stein y la Dra. Julia Figueroa) y de Salto Grande, Uruguay (cedido por la Ing. Ana Bertalmío y su equipo), de la estación experimental del INIA del mismo lugar. Este material corresponde al grupo de muestras denominado “plantas adultas” (Figura 2).

El análisis de todas estas muestras por RT-qPCR fue realizado a ciegas, es decir, no se contaba con los resultados parciales ni final del IB. Las muestras incluían hojas adultas y brotes jóvenes con y sin manchas cloróticas visibles. Entre las 37 plantas adultas algunas mostraban sintomatología del grupo psorosis y otras provenían de plantas

saneadas, esto quiere decir, certificadas como plantas libres de enfermedades de acuerdo a la normativa vigente.

En total se evaluaron 37 plantas adultas de colección y 91 plantas candidatas de 3 campañas 2017/2018, 2018/2019 y 2019/2020; éstas últimas generaron 582 muestras de brotes jóvenes provenientes de los plantines indicadores del IB, en 3 brotaciones sucesivas (Figura 2).

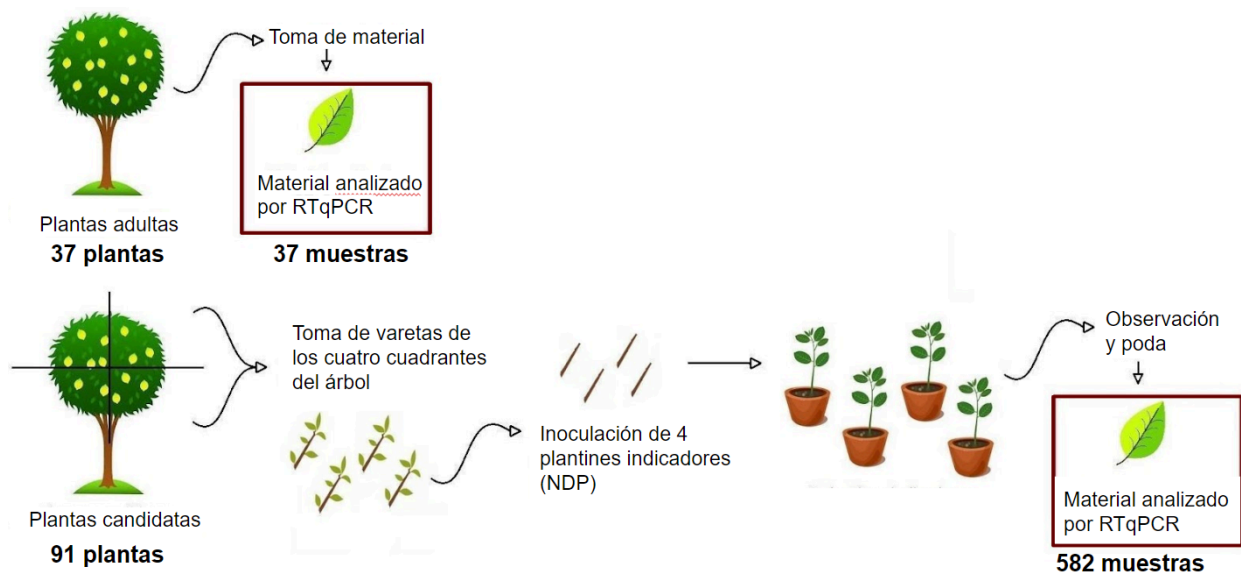


Figura 2: Esquema de la procedencia del material analizado por RT-qPCR. Se utilizaron dos tipos de material foliar: hojas provenientes de plantas adultas (37 muestras provenientes de 37 plantas) y brotes provenientes de la poda de los plantines indicadores utilizados en el IB correspondiente a las campañas de certificación llevadas a cabo en CUIS - INTA, Concordia durante las campañas 2017/2018, 2018/2019 y 2019/2020 (582 muestras provenientes de 91 plantas candidatas). Modificado de Simeone *et al.*, 2020.

El grupo de trabajo del Ing. Claudio Gómez envió a nuestro laboratorio 1092 muestras de material de poda, que corresponde a las 91 plantas candidatas cuyo material fue injertado en 4 plantines, cada uno de los cuales fueron observados y podados en 3 brotaciones (91x4x3) durante el período 2017-2020. A pesar de su trabajo y dedicación, un gran número de muestras se perdieron debido a problemas con el servicio de transporte y el análisis fue realizado sobre 582 muestras.

De esta manera, se analizaron mediante ambos métodos 619 (582 + 37) muestras de cítricos provenientes del NEA, NOA y Uruguay. Estas plantas incluyen plantines jóvenes, árboles adultos, plantas de campo, de invernadero y de colección y de distintas variedades cítricas. Para el análisis estadístico comparativo se consideró al resultado por IB como verdadero estado sanitario de la planta, y en base a esto se calcularon los estadísticos de sensibilidad (Se), especificidad (Sp) y *likelihood ratios* (LRs). También se evaluó la concordancia entre el IB y la técnica de RT-qPCR, utilizando el índice Kappa de Cohen (Cohen, 1960), el test de McNemarX2 y el kappa ajustado por prevalencia y sesgo (PABAK, *prevalence and bias adjusted kappa*).

### 3.4.2 Diagnóstico de CPsV: concordancia entre resultados del IB y RT-qPCR

En el diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos, una planta se considera enferma por IB (IB+) cuando al menos uno de los cuatro plantines indicadores muestran síntomas de *flecking*, hoja de roble o *shock* necrótico en brotes jóvenes, en al menos dos brotaciones sucesivas. El resultado es posteriormente confirmado para psorosis A con el ensayo de protección cruzada.

El criterio adoptado para la aplicación de la técnica de RT-qPCR fue considerar positiva una planta candidata cuando se detecte CPsV en al menos uno de los cuatro plantines indicadores en al menos dos brotaciones sucesivas.

Para el caso de las 37 plantas adultas de colección evaluadas se utilizó un criterio distinto. Se tomó el resultado directo de la RT-qPCR como diagnóstico de la enfermedad, es decir, si se detectó CPsV por RT-qPCR en material foliar extraído de la planta adulta, ésta se consideró infectada.

El siguiente análisis estadístico se aplicó a la sumatoria de 37 plantas adultas y 91 plantas candidatas, dando un total de 128 plantas analizadas. Nuevamente, para este análisis se consideró el resultado del IB como el verdadero estado sanitario de la planta.



### 3.4.2.1 Estadísticos evaluados

Prevalencia aparente: La prevalencia es la proporción de individuos de una población que presentan una característica específica en un momento determinado. En este caso, se trata de la proporción de individuos infectados con CPsV dentro de las muestras analizadas. La prevalencia aparente es simplemente el cálculo de resultados positivos dividido el total de muestras analizadas.

Prevalencia verdadera: Es una estimación de la prevalencia en el total de la población. Se calcula a partir de los valores de prevalencia aparente, sensibilidad y especificidad del método de detección.

Sensibilidad (Se): Se define como la proporción de individuos infectados que presentarán resultados positivos al aplicarse el método de detección. Un método 100% sensible es capaz de identificar a todos los individuos que se encuentren infectados. Se calcula tomando el número de verdaderos positivos y dividiéndolo por la sumatoria de verdaderos positivos y falsos negativos (esto es, el número total de individuos infectados en la población analizada).

Especificidad (Sp): Se trata de la proporción de individuos no infectados que obtendrán resultados negativos al aplicarse el método de detección. Un método 100% específico es capaz de identificar a todos los individuos que no se encuentren infectados. Se calcula dividiendo el número de verdaderos negativos por la sumatoria de verdaderos negativos más el total de falsos positivos (esto es, el número total de individuos no infectados en la población analizada).

Valor predictivo positivo (PV+): Es la probabilidad de que un resultado positivo se corresponda con una infección. Se ve influenciado por la incidencia de la enfermedad en la población y se calcula como el número de verdaderos positivos dividido la sumatoria de verdaderos positivos más el número de falsos positivos.

Valor predictivo negativo (PV-): Es la probabilidad de que un resultado negativo se corresponda con individuo no infectado. Se calcula como el número de verdaderos negativos dividido la sumatoria de verdaderos negativos más el total de falsos negativos.

Positive likelihood ratio (LR+): Se calcula como  $Se/(1 - Sp)$ . Se trata de la probabilidad de que una muestra infectada dé un resultado positivo dividida la probabilidad de que una muestra no infectada dé un resultado positivo.

Negative likelihood ratio (LR-): Se calcula como  $(1 - Se)/Sp$ . Se trata de la probabilidad de que una muestra infectada dé un resultado negativo dividida la probabilidad de que una muestra no infectada dé negativo.

Kappa de Cohen: El coeficiente  $\kappa$  es un estadístico que ajusta el efecto del azar en la concordancia observada entre dos métodos. Se lo considera una medida más robusta que el cálculo de concordancia porcentual ya que considera las coincidencias debidas al azar. El resultado numérico de este índice fue categorizado utilizando los límites de Landis y Koch (Landis y Koch, 1977), que definen:  $\kappa < 0,00$  como baja concordancia,  $0,00 < \kappa < 0,2$  como ligera concordancia,  $0,21 < \kappa < 0,40$  como concordancia intermedia,  $0,41 < \kappa < 0,6$  como concordancia moderada,  $0,61 < \kappa < 0,8$  como concordancia sustancia y finalmente  $0,81 < \kappa < 1,00$  como concordancia casi perfecta.

PABAK: Prevalence and Bias Adjusted Kappa. Se trata de un estadístico calculado a partir del coeficiente  $\kappa$  de Cohen, que además tiene en cuenta los factores de sesgo y prevalencia. Se lo considera más estricto que el  $\kappa$ .

Test de McNemarX<sup>2</sup>: Este análisis permite evaluar los efectos de sesgo dentro del conjunto de muestras sometidas a dos tests (en este caso, IB y RT-qPCR). Si el resultado de este test es significativo ( $p\text{-value} < 0,05$ ), el PABAK es una representación más estricta de la concordancia que el  $\kappa$ .

### 3.4.2.2 Análisis estadístico comparativo entre ambas técnicas

En la Tabla 1 se muestran los resultados finales dados por el IB y por la RT-qPCR.

Los resultados de la columna correspondiente al IB son las conclusiones derivadas de las cinco observaciones más el ensayo de protección cruzada, realizados de la manera ya descrita en las estaciones experimentales que cedieron el material vegetal (INTA Tucumán, INTA Concordia e INIA Salto Grande, Uruguay).

Los resultados de la columna correspondiente a la RT-qPCR corresponden al resultado directo del análisis del material vegetal en las muestras denominadas “plantas adultas”. Para estas muestras ya se contaba con el resultado del análisis por IB realizado en años anteriores por las estaciones experimentales correspondientes.

En las muestras denominadas “plantas candidatas” se evaluó por RT-qPCR la presencia de CPsV en los plantines indicadores correspondientes a las 3 primeras brotaciones del análisis por IB. Se consideró a una planta candidata RT-qPCR+ cuando se detectó CPsV en el material proveniente de al menos uno de los cuatro plantines indicadores en al menos dos brotaciones sucesivas.

Tabla 1: Comparación de los parámetros de diagnóstico entre IB y RT-qPCR para la detección de CPsV en 128 plantas.

	BI+	BI -	
RTqPCR +	23	0	
RTqPCR -	0	105	
			128

Estimaciones puntuales e intervalos de confianza (95%):

---

Prevalencia aparente	0.18 (0.12, 0.26)
Prevalencia verdadera	0.18 (0.12, 0.26)
Sensibilidad (Se)	1.00 (0.85, 1.00)
Especificidad (Sp)	1.00 (0.97, 1.00)
Valor predictivo positivo (PV+)	1.00 (0.85, 1.00)
Valor predictivo negativo (PV-)	1.00 (0.97, 1.00)
Positive likelihood ratio (LR+)	Inf
Negative likelihood ratio (LR-)	0.00

Como se puede observar, la concordancia entre estos métodos es perfecta. Es importante notar que el análisis por RT-qPCR no arrojó falsos positivos ni falsos negativos.

Con estos resultados, el LR- toma un valor cero y el LR+, infinito. La sensibilidad, especificidad PV+ y PV- resultaron en sus valores máximos posibles, 1. Esto se debe a

la forma matemática de las ecuaciones de estos estadísticos y a la ausencia de resultados falsos positivos y falsos negativos.

### 3.4.3 Concordancia entre la observación de síntomas y la técnica de RT-qPCR en cada plantín indicador

Con el propósito de evaluar la sensibilidad de la RT-qPCR frente a la observación de síntomas (SyO) se tomaron los resultados arrojados en cada uno de los plantines indicadores como una muestra independiente, analizando la concordancia entre ambos resultados (Tabla 2). Para este análisis se consideró a la presencia de síntomas (SyO (+)) como el verdadero estado sanitario de la planta. Nuevamente, es necesario definir el verdadero estado sanitario de la muestra para poder realizar estos cálculos.

En total se analizaron 582 muestras, que corresponden a los brotes extraídos de las 91 plantas candidatas: 91 (plantas candidatas) x 4 (plantines indicadores) x 3 (brotaciones y podas) = 1092 muestras de las cuales sólo 582 pudieron ser evaluadas.

Tabla 2: Concordancia entre observación de síntomas (SyO) y análisis por RT-qPCR en cada plantín indicador.

	SyO (+)	SyO (-)	
RTqPCR +	32	5	
RTqPCR -	0	545	
			582

#### Estadísticos

Resultados coincidentes (%)	99.14
Índice kappa de Cohen	0.92 ± 0.04
Test de McNemar X2 (p-value)	5.00 (0.025)
PABAK (±IC)	0.98 ± 0.01

En este análisis se aplicó el índice Kappa de Cohen y el PABAK, dando 0.92 y 0.98 respectivamente, valores que se encuentran dentro del rango interpretado como concordancia perfecta (0.81-1.00), con resultados que coincidieron en el 99,14% de los casos.

En este análisis se puede observar que, de 582 muestras, el método de RT-qPCR presenta 577 coincidencias y 5 discrepancias con la observación de síntomas. Estas discrepancias corresponden a muestras que no presentaban síntomas pero en las que se detectó CPsV por RT-qPCR. Al tomarse la observación de síntomas como verdadero estado sanitario de la planta, éstas 5 muestras corresponden a resultados de la categoría “falsos positivos” para la RT-qPCR.

Dos de estas muestras corresponden a errores técnicos de la RT-qPCR, lo que se deduce de la repetición de la síntesis de los cDNA y reacciones de RT-qPCR, ya que no se detectó CPsV en dichas repeticiones. Además, estos resultados positivos corresponden cada uno a un solo plantín indicador en una sola brotación, lo que no cumple con el criterio definido para considerar que la planta candidata correspondiente se encontraba infectada.

Las tres discrepancias restantes corresponden a controles positivos del IB, es decir, plantines de NDP que fueron inoculados con material proveniente de plantas infectadas con el aislamiento CPsV 90-1-1 utilizado como control positivo para el ensayo de IB. Una de estas discrepancias proviene de la primera brotación, y las dos restantes de la tercera brotación. En estos tres casos la infección se confirmó a lo largo del ensayo mediante observaciones de síntomas en las brotaciones sucesivas o previas. Esto indica que la técnica de RT-qPCR es capaz de detectar CPsV en muestras infectadas incluso cuando estas no presentan síntomas

Los resultados de los 577 plantines restantes fueron coincidentes entre ambos métodos.

#### 3.4.4 Concordancia entre la observación de síntomas y la técnica de RT-qPCR en cada brotación

Luego del análisis de observación de síntomas y RT-qPCR de cada plantín indicador surge la pregunta de si las discrepancias observadas entre observación de síntomas y

RT-qPCR en cada plantín se correspondían con alguna de las brotaciones. Por esto se realizó un análisis agrupando las muestras por brotación.

El número de muestras tomadas de los brotes provenientes de la poda de cada brotación fueron 582. 312 corresponden a la primera brotación, 149 a la segunda y 121 a la tercera.

Se calcularon los estadísticos ya definidos para cada grupo por separado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Parámetros de diagnóstico y medidas de concordancia entre la observación de síntomas (SyO) y la técnica de RT-qPCR en muestras provenientes de la primera, segunda y tercera brotación.

<b>Parámetro</b>	<b>1era brotación</b>	<b>2da brotación</b>	<b>3era brotación</b>
Se	1	1	1
Sp	0.993	0.993	0.988
Prevalencia (%)	5.45%	4.7%	10.74%
Coincidencia (%)	99.35%	99.31%	98.9%
Kappa de Cohen	0.913 ± 0.06	0.797 ± 0.08	0.917 ± 0.07
McNemar X2 (p-value)	2 (0.16)	1 (0.32)	2 (0.16)
PABAK	0.987 ± 0.06	0.986 ± 0.07	0.978 ± 0.1
N	312	149	121

En todos los casos se observa una coincidencia mayor al 98% y los índices kappa de Cohen correspondientes están dentro del rango considerado concordancia casi perfecta (0,81-1,00) con la excepción de la segunda brotación, cuyo índice corresponde a una concordancia sustancial (0,61-0,80).

El índice kappa de Cohen puede verse disminuido por efectos de sesgo y prevalencia (ya sea prevalencia muy alta o muy baja). A pesar de la ausencia de sesgo sistemático en las tres brotaciones (McNemar p-value > 0,05) no se puede decir lo mismo de la prevalencia. Un efecto de prevalencia existe cuando la proporción de coincidencia en la categorización positiva difiere de la de la clasificación negativa. En este caso la prevalencia es muy baja, la concordancia por azar es elevada por lo que hace que el valor de kappa de Cohen disminuya (Byrt *et al.*, 1993). Es por esto que el PABAK es una medida más estricta en estos casos. Como se puede observar en la Tabla 3, los valores de PABAK se encuentran dentro del rango de concordancia casi perfecta para las tres brotaciones.

Estos resultados indican que la capacidad del test de RT-qPCR para detectar CPsV en los brotes de plantines indicadores que fueron inoculados con material proveniente de plantas candidatas es igual en las tres primeras brotaciones.

### 3.4.5 Correlación entre intensidad de síntomas y carga viral

Generalmente existe una correlación entre la intensidad de los síntomas manifestados por una planta enferma y la carga viral presente en el tejido. En el caso de psorosis esa correlación se ha observado frecuentemente pero no se han realizado estudios cuantitativos que permitan afirmarlo. Otros factores abióticos como irrigación y temperatura y factores bióticos como la presencia de otros patógenos pueden afectar la expresión de síntomas.

Con el fin de analizar si la intensidad de síntomas manifestada se correlaciona con la carga viral, se comparó la intensidad de los síntomas mediante un valor obtenido por observación, denominado *Symptom Score* (SS) descrito por De Francesco *et al.* (2020) y la carga viral obtenida a partir de los resultados de la RT-qPCR. Para este análisis se utilizaron las muestras de plantines indicadores NDP identificadas como positivas provenientes de las campañas de certificación llevadas a cabo en el INTA Concordia en los años 2017/2018, 2018/2019 y 2019/2020.

El SS asigna un valor numérico a cada observación, proporcional a la intensidad de síntomas. El rango de este valor va de 0 a 9 y se calcula sumando los valores asociados a cada síntoma: *flecking* y clorosis leves = 1; *flecking* y clorosis moderadas = 2; *flecking* y clorosis severos = 3; shock leve = 4; shock moderado = 5; shock severo = 6.

Para la medida de la carga viral por RT-qPCR se calculó el número de fragmentos de RNA del gen de la proteína de cubierta (CP) cada 100 fragmentos de RNA del gen de ubiquitina (UQ) utilizado como referencia interna, en las 29 muestras positivas (Figura 3).

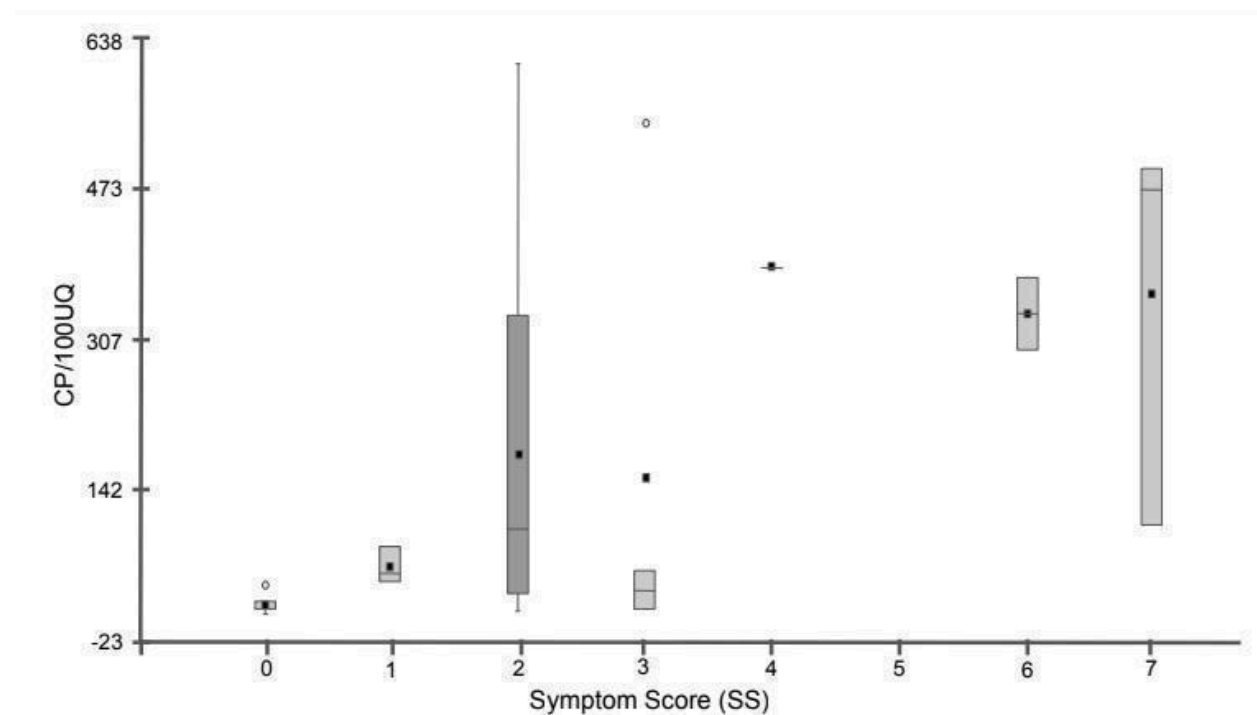


Figura 3: *Box plot* de la comparación del SS con la carga viral. Las líneas verticales representan el rango de los datos, los rectángulos grises abarcan los datos entre los cuartiles 1 y 3, los puntos negros representan el promedio, las líneas horizontales la media y los círculos vacíos son los datos eliminados por el software utilizado para el análisis de datos (InfoStat) por alejarse demasiado de la media.

Al observar la Figura 3 se puede apreciar una aparente tendencia si sólo se observan los puntos del gráfico (correspondientes al promedio de CP/100UQ para el grupo de plantas de SS correspondiente en el eje X). Sin embargo, debido al amplio rango de datos (especialmente dentro de los grupos correspondientes a SS = 2 y SS = 7) éstos no ajustan a una regresión lineal.

Estos resultados indican que no existe una concordancia entre la intensidad de los síntomas con la carga viral.



### 3.4.6 Aplicación de la técnica de RT-qPCR y su incorporación a la normativa argentina vigente

En colaboración con el Ing. Claudio Gómez (INTA Concordia) y en base a estos resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se presentó al INASE un protocolo diseñado para ser aplicado como técnica de diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos, cuyo agente causal es CPsV.

La técnica de RT-qPCR fue incorporada a las normativas para el diagnóstico de la enfermedad como un método alternativo al TAS-ELISA descrito anteriormente (Resolución 479/2023 RESOL-2023-479-APN-INASE#MEC <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/385000-389999/388023/norma.htm>)

### 3.4.7 Presencia de CCGaV en el NEA, NOA y Salto Grande, Uruguay

Dentro del material recibido de las regiones del NEA, NOA y Uruguay se contaba con muestras provenientes de plantas adultas de colección que reportaban presentar un cuadro de concave gum.

Se realizaron análisis para la detección de citrus concave gum associated virus (CCGaV) en los extractos de RNA total provenientes de diversas muestras de material vegetal. Dentro de estas muestras, las procedentes de Tucumán y Salto Grande presentaban síntomas asociados a concave gum (hoja de roble y manchas cloróticas en hojas y concavidades en el tronco) y se trataba de plantas adultas de colección. Las procedentes de Concordia fueron tres: dos plantas candidatas evaluadas durante las campañas de certificación de cítricos (muestras 3476 y 3478) y una analizada durante un re testeo de plantas de la estación realizado periódicamente (muestra FM). Las muestras procedentes de Concordia sólo presentaban síntomas de *flecking* en hojas jóvenes.

Con respecto a las muestras 3476 y 3478, se trata de plantas candidatas analizadas en el CUIS de INTA Entre Ríos durante la campaña 2018/2019. Se analizó el material proveniente de las indicadoras del IB, *id est*, material foliar joven de NDP, pero las plantas recibidas por la estación experimental eran pertenecientes a la variedad citrange carrizo (*Poncirus trifoliata* x *Citrus sinensis*). En ambas muestras se detectó tanto CCGaV como CPsV, demostrando la capacidad de estas técnicas de detectar infecciones mixtas y resaltando la necesidad de contar con métodos capaces de distinguir entre diversos agentes causales.

Para esto se utilizaron los cebadores diseñados por la Dra. Mari Carmen Vives (comunicación personal) para la síntesis de cDNA y subsecuente PCR a tiempo final. Los resultados se encuentran resumidos en la siguiente tabla y en la Figura 4:

Tabla 4: Resultados de la detección por RT-PCR de CCGaV de muestras de diversas variedades de cítricos y procedencias.

Muestra	Resultado PCR	Origen	Cítrico
BCG	Positiva	Salto grande, Uruguay	Tangor (mandarina, <i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i> )
R0002	Positiva	Tucumán	Naranja Valencia ( <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)
R0178	Positiva	Tucumán	Rouge la toma (pomelo, <i>Citrus</i> x <i>paradisi</i> Macf.)
R0202	Positiva	Tucumán	Rouge la toma (pomelo, <i>Citrus</i> x <i>paradisi</i> Macf.)
R0205	Negativa	Tucumán	Rouge la Toma (pomelo, <i>Citrus</i> x <i>paradisi</i> Macf.)
R-0389	Negativa	Tucumán	Pomelo Henderson (pomelo, híbrido de <i>Citrus grandis</i> (L.) Osbeck)
R-0206	Positiva	Tucumán	Rouge la Toma (pomelo, <i>Citrus</i> x <i>paradisi</i> Macf.)
R-0127	Positiva	Tucumán	Citrango carrizo Jujuy ( <i>Citrus triptera</i> x <i>C. sinensis</i> )
R-2392	Positiva	Tucumán	Naranjo Agrio Tucumán ( <i>Citrus</i> x <i>aurantium</i> )
R-1666	Positiva	Tucumán	Mandarina (híbrido de <i>C. reticulata</i> )
3476	Positiva	Concordia, Entre Ríos*	NDP ( <i>C. sinensis</i> L. Osbeck)
3478	Positiva	Concordia, Entre Ríos*	NDP ( <i>C. sinensis</i> L. Osbeck)
FM	Positiva	Concordia, Entre Ríos	Folha Murcha (variedad de naranja Valencia, <i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck)

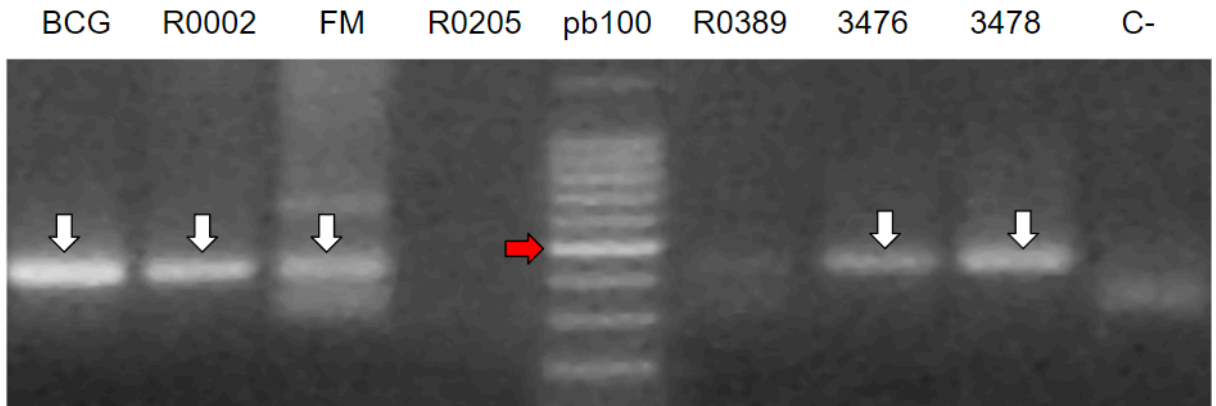


Figura 4: Visualización de los productos de PCR de 7 de las muestras evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1%-TAE. El producto esperado es de 417 pb (flechas blancas). La flecha señala la banda del marcador de peso molecular correspondiente a 500 pb.

Como indica la tabla, los cebadores fueron capaces de detectar aislamientos locales de CCGaV con la excepción de el o los aislamientos presentes en 2 muestras provenientes de Tucumán. Los fragmentos generados poseen el tamaño esperado pero no fue confirmada su secuencia nucleotídica.

## 3.5 Discusión

El IB ha sido aplicado en nuestro país como único método de diagnóstico de psorosis por más de 30 años (Anderson, 2000). El análisis estadístico presentado muestra una concordancia casi perfecta entre esta técnica y la RT-qPCR, demostrando que el método molecular puede ser aplicado para el diagnóstico de psorosis con una elevada sensibilidad.

Es importante destacar que en la totalidad del trabajo no se encontraron resultados del tipo falsos negativos por la técnica de RT-qPCR, lo que significa que el riesgo de propagación de la enfermedad por material falsamente identificado como sano es despreciable. Además, en 3 ocasiones el protocolo de RT-qPCR fue capaz de detectar la presencia de CPsV en brotes asintomáticos de plantas indicadoras que en otras brotaciones habían presentado síntomas y habían sido inoculadas con material infectado. Estos resultados sugieren que esta técnica es más sensible que el IB en estas condiciones.

La primer discrepancia entre métodos corresponde a una primera brotación y se considera que la carga viral aún no era suficiente para manifestar síntomas, mientras que la sensibilidad de la técnica molecular permitió detectar la presencia de CPsV. Las otras dos discrepancias corresponden a muestras provenientes de la tercera brotación, que habían desarrollado síntomas en la primera y segunda brotación. Es muy probable que se trate de plantas que lograron recuperarse del cuadro de psorosis (*recovery*), lo que ocurre gracias a las defensas de la planta (e. g., por silenciamiento génico) y disminuye la carga viral impidiendo la expresión de síntomas, pero aún así siendo detectado por RT-qPCR.

Con respecto a estas tres muestras discrepantes, es relevante señalar que el resultado positivo de CPsV por RT-qPCR se tomó como un error del tipo falso positivo porque para realizar el análisis estadístico comparativo entre ambas técnicas se parte de la premisa que el resultado de la observación de síntomas es el verdadero estado sanitario de la planta. Por lo tanto, es más correcto decir que se trataban de falsos negativos del IB debido a la baja carga viral al momento de realizar la observación.

Por otro lado, en todos los casos positivos hubo detección tanto de síntomas como de CPsV por RT-qPCR en la primera y/o segunda brotación. No hubo muestras positivas que no hubieran sido detectadas por cualquiera de los métodos en las primeras dos

brotaciones. Recordando que el IB requiere de 5 brotaciones totales, sería posible disminuir el número de brotaciones sin dejar de detectar aquellas plantas infectadas.

Con estos resultados es posible plantear una revisión del procedimiento del IB en la que sólo se tengan en cuenta las observaciones realizadas en las primeras dos brotaciones y se complementen estas observaciones con análisis de RT-qPCR sobre el material de poda. Esto permitiría obtener un diagnóstico rápido de la enfermedad, además de disminuir los costos actuales del IB y reducir los espacios utilizados para el mantenimiento de las plantas indicadoras, permitiendo a su vez analizar un mayor número de plantas por año.

Es importante recordar que la distribución del virus dentro de la planta es heterogénea. Considérese una planta infectada con CPsV; de tomarse por azar muestras de la parte de la planta que no presenten CPsV en cantidades suficientes como para ser detectado, los resultados de la detección por RT-qPCR serían negativos y se clasificaría erróneamente a esa planta como sana. Por esto se destaca el valor del IB, que reside en la multiplicación del virus dentro del plantín indicador. Este plantín no sólo se trata de una especie vegetal sensible sino que además es podado al momento de la inoculación, lo que estimula la generación de brotes jóvenes que es donde el virus se acumula en mayor concentración (García *et al.*, 1991).

Alternativamente se propone un reemplazo directo de la técnica tradicional por la molecular, teniendo en cuenta que será necesario tomar múltiples muestras por planta para asegurar el relevamiento de material infectado en caso de que la planta se encuentre infectada. Esto sólo se propone para los análisis de plantas de viveros dentro del mercado cítrico local. Para el caso de material vegetal que se quiera ingresar al país se propone mantener la normativa actual que es coincidente con la aplicada en la UE y EEUU, mediante una cuarentena. Un método de diagnóstico molecular aplicado a material de cuarentena permitiría la identificación de virus conocidos y con esto el monitoreo de las enfermedades presentes en el mercado cítrico mundial, así como su procedencia. Esto disminuiría el período de cuarentena o al menos permitiría identificar el virus presente en las muestras y con ésto permitiría conocer qué técnicas aplicar para el saneamiento del material.

El protocolo de RT-qPCR planteado podría además modificarse para incorporar la detección simultánea de varios virus que afectan a los cítricos. Los resultados del análisis con cebadores para la detección de CCGaV demuestran que las infecciones mixtas ocurren y que es importante contar con un método que permita discernir entre diversas especies virales. La observación de síntomas del IB permite evitar el ingreso

de plantas enfermas al mercado citrícola, pero no permite un análisis de la incidencia de cada enfermedad en la zona.

Por último, la gran variabilidad de resultados al evaluar la cantidad de moléculas de CP viral por cada 100 moléculas de ubiquitina no mostró una proporcionalidad entre este valor y la intensidad de síntomas observados, un resultado inesperado debido a que la bibliografía reporta cierta correlación entre la manifestación de los síntomas con la detección de CPsV (Velázquez *et al.*, 2010).

## 3.6 Conclusiones

- La concordancia (PABAK) entre resultados obtenidos se encuentra dentro del rango interpretado como concordancia casi perfecta ( $\geq 0,8$ ), tanto para el caso del análisis de RT-qPCR vs IB como el de RT-qPCR vs SyO.
- La presencia de resultados falsos positivos (tanto errores técnicos como infecciones asintomáticas) demuestran que la RT-qPCR es un método más sensible que el IB.
- La ausencia de resultados falsos negativos demuestran que la técnica de RT-qPCR es altamente específica, como ya lo había demostrado De Francesco *et al.*, (2015).
- Los valores de PV+ y PV- corresponden a las proporciones de los resultados positivos y negativos que son verdaderos positivos y verdaderos negativos respectivamente. Estos estadísticos adquirieron sus valores máximos dentro de este análisis, lo que indica que la técnica es altamente precisa. Esto se debe a la ausencia de resultados falsos negativos y falsos positivos.
- No se observó correlación entre la carga viral e intensidad de síntomas en material foliar de las plantas NDP de invernáculo utilizadas como indicadoras en el IB.
- La RT-qPCR permite identificar la presencia específica de CPsV, en contraste con el IB que sólo determina la presencia de una infección viral capaz de manifestar síntomas comunes a varios agentes, como los pertenecientes al “grupo psorosis”.
- La técnica de RT-qPCR ha sido valorada y validada como método de diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos, y por lo tanto, puede ser incorporada a la normativa argentina como método para el diagnóstico de psorosis de los cítricos.

## 3.7 Perspectivas

Siendo la técnica molecular más sensible que el tradicional IB, junto con la revisión propuesta al procedimiento usado para la certificación de plantas de viveros también se puede plantear la posibilidad de añadir al análisis la detección de otros virus presentes en la zona. Como ya se mencionó, en los últimos años han sido publicados cebadores para la detección de citrus virus A (De Bruyn *et al.*, 2022) y en este trabajo se han evaluado los cebadores para la detección de CCGaV, enfermedades pertenecientes al antiguamente denominado “grupo psorosis” cuya incidencia en nuestro país es desconocida, pero que causan síntomas similares a los causados por CPsV en los plantines utilizados para el IB.

De esta manera se podrá monitorear las enfermedades presentes en el mercado local. Además, como método de diagnóstico no sólo sería aplicable al material vegetal certificado local, sino también al material de cuarentena ayudando a su detección más temprana. El análisis de material de cuarentena sólo se interrumpiría al encontrarse evidencia molecular de presencia de patógenos y en los casos de resultados negativos el procedimiento se mantendría con la metodología actual para minimizar la probabilidad de ingresar patógenos al mercado citrícola local.

Para poder realizar un monitoreo de la incidencia y procedencia de las enfermedades pertenecientes al previamente denominado grupo psorosis será necesario contar con cebadores específicos para cada una de ellas. Para esto será necesario una secuenciación masiva de muestras provenientes de distintas zonas productivas del país y un posterior análisis bioinformático, junto con diseño de los cebadores apropiados para el diagnóstico simultáneo de todas las especies virales encontradas. Esto generaría un nuevo protocolo para el diagnóstico de estas enfermedades, que deberá ser evaluado adecuadamente previo a su implementación.



# CAPÍTULO 4: TRANSMISIÓN DE CPsV POR ÁFIDOS



## 4.1 Introducción

### 4.1.1 Áfidos como posible vector de CPsV

Como ya ha sido mencionado, la manifestación de los síntomas de psorosis puede llevar hasta 15 años en árboles a campo donde la transmisión es natural. Es por eso que previo a la aplicación de programas de certificación del material vegetal en varias regiones cítricas del mundo se propagaba material infectado sin detectar la presencia del virus.

Posteriormente, mediante la aplicación de programas de certificación de material vegetal libre de virus en base al ensayo biológico sobre plantines indicadores (descrito en el Capítulo 3), se logró disminuir su incidencia y controlar la enfermedad. Aun así, actualmente se siguen encontrando nuevos árboles infectados en campos, lo que sugiere la existencia de un vector natural. Como antecedentes a estas observaciones, Pujol y Beñatena (1965), describieron una distribución aleatoria de árboles afectados, sugiriendo un insecto alado como vector de la enfermedad.

Más adelante, en la década de los '80 se reportaron ensayos que señalaban la difusión natural de psorosis observada en EEUU (Timmer y Garnsey, 1980). Luego Portillo (1983) y Beñatena y Portillo (1984) sugieren a *Toxoptera* spp. (Figura 1) y *Aphis citricola* como posibles vectores de la enfermedad.



Figura 1: Ninfas (marrones) y adulto (negro) de *Toxoptera citricida*, fotografía cedida por el Dr. Juan Pedro Bouvet (EEA-INTA Concordia, Entre Ríos).

En estos estudios la presencia de psorosis era determinada mediante la lectura de síntomas asociados a la enfermedad. Como se mencionó en la introducción general, los síntomas que provoca CPsV no son específicos de la enfermedad psorosis, sino que también son causados por otros patógenos que provocan las enfermedades ringspot, concave gum, impietratura, cristacortis y infectious variegation-crinkly leaf, (Wallace, 1978). Debido a esto y antes de que CPsV haya sido descrito como agente causal de psorosis, estas enfermedades se las agrupaba como el “grupo psorosis”. Por lo tanto, los ensayos no necesariamente eran específicos para CPsV, sino que la sintomatología observada podría haberse debido a la presencia de otros virus causales de este grupo de enfermedades. Es por eso que estos resultados no fueron concluyentes.

Posteriormente, entre los años 1995-2000 se realizaron ensayos de transmisión de CPsV en la región citrícola de Uruguay (Maeso *et al.*, 2000). En estos ensayos se tomaron 114 plantines de Madame Vinous (*Citrus x aurantium* L. var. *sinensis*, de ahora en adelante MV) y naranjo dulce Pineapple (*Citrus sinensis* L. Osbeck, de ahora en adelante NDP) de un año de edad crecidos en invernáculos a prueba de insectos. Estos plantines fueron cultivados en macetas que fueron trasladadas a una parcela de naranja Ombligo Washington (híbrido de *Citrus sinensis*) con alta incidencia de psorosis, determinada por *indexing* biológico (IB). Los plantines fueron colocados alrededor de árboles con síntomas de psorosis (Figura 2A). A modo de control se colocaron en el mismo cultivar 48 plantines cubiertos por mallas anti áfidos. Uno de los 144 plantines expuestos desarrolló shock en brotes jóvenes y la presencia de psorosis se confirmó posteriormente mediante IB. Los autores concluyen que esta transmisión podría haber sido mediada por *T. citricida*, ya que fue el insecto observado con mayor frecuencia en los plantines expuestos (Maeso *et al.*, 2000).

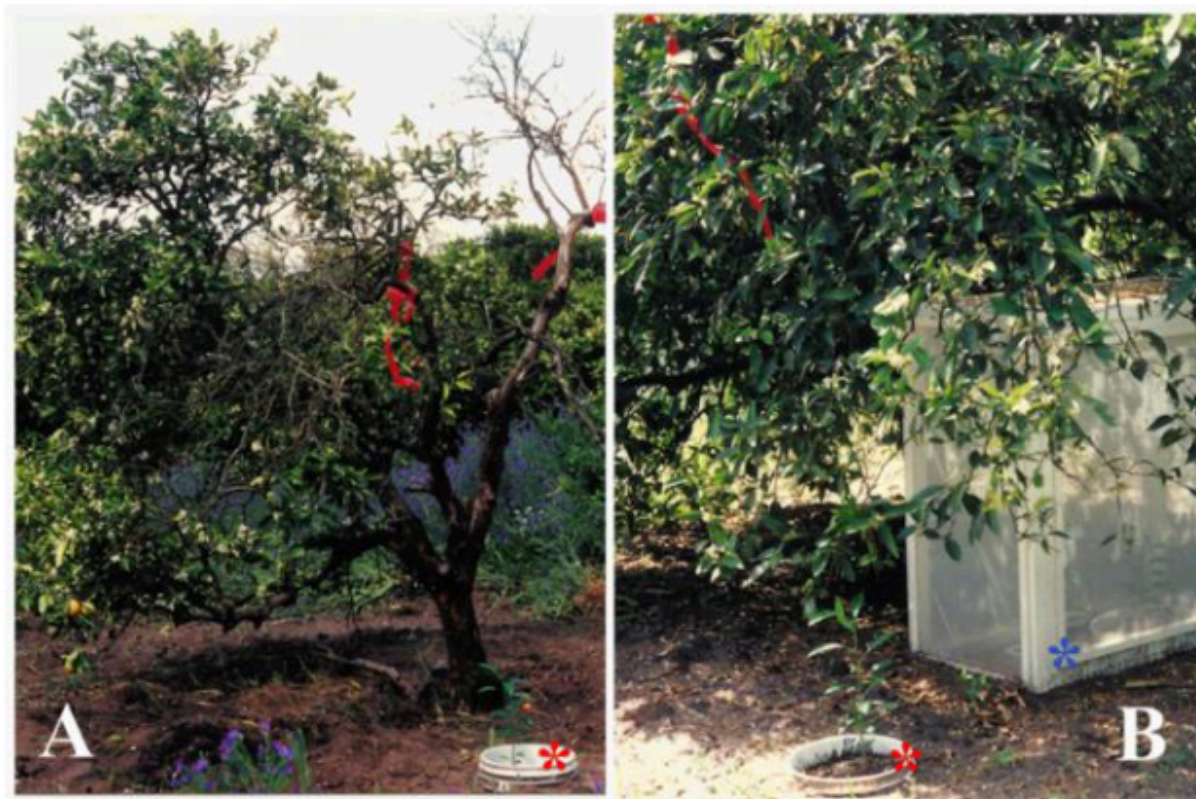


Figura 2: Ensayo realizado por el grupo de investigación del Dr. Maeso para evaluar la transmisión natural de CPsV en naranja dulce en un campo comercial en el departamento de Salto, Uruguay en 1995. A: plantines de NDP en macetas de plástico (asterisco rojo) aisladas del suelo colocadas alrededor de un árbol con síntomas de psorosis (ramas señaladas con cintas rojas). B: plantín no expuesto a insectos alados, aislado con malla anti áfidos, utilizado como control negativo (asterisco azul). Tomado de Maeso *et al.*, 2000.

Costa *et al.* (2013) realizaron un ensayo similar en INTA-Concordia, Entre Ríos. Se tomaron plantines jóvenes de NDP que se encontraban en almácigos aislados del suelo y se colocaron alrededor de árboles de campo de más de 20 años de edad infectados con psorosis, cuya infección fue confirmada por IB. Luego de unos meses fueron observados y se encontró que presentaban síntomas asociados a psorosis (*flecking* y manchas cloróticas en el material foliar). Estos plantines sintomáticos no fueron analizados para determinar la presencia de CPsV. Por lo tanto, este ensayo sólo asocia la transmisión aérea de algún factor capaz de producir síntomas de *flecking* y clorosis en hojas jóvenes de NDP.

Luego, en 2020 Hernández-Rodríguez *et al.* realizaron dos ensayos para evaluar la transmisión de CPsV por *T. citricida*. Para ambos ensayos utilizaron plantines de MV y

colonias de áfidos libres de enfermedades establecidas en plantas de Citron Etrog (*Citrus medica* L.).

En el Experimento 1, llamado Colonización Libre, 12 plantines MV junto con una planta fuente de CPsV y una colonia de áfidos alados fueron introducidas en jaulas cubiertas con malla anti áfido. En total se utilizaron 4 jaulas (Figura 3, A-D). Las plantas se mantuvieron en estas jaulas hasta que se observaron sub-colonias en todos los plantines MV, lo que demoró 30 días aproximadamente. Luego de este período se asperjó insecticida para eliminar a los áfidos.

En el Experimento 2, llamado Colonización Inducida, transfirieron 5 áfidos adultos no alados de cada una de las colonias alimentándose de las plantas fuente de CPsV a brotes jóvenes de plantines MV sanos (a razón de 3 plantines MV por cada planta fuente de CPsV) bajo condiciones de temperatura controladas (18 - 27°C). Luego del traslado de los áfidos, cada brote fue cubierto con una bolsa plástica transparente, que a su vez fue cerrada alrededor del tallo para limitar el movimiento del insecto (Figura 3E-G). Se permitió a los áfidos alimentarse durante un período de 72 horas y luego fueron eliminados con insecticida.



Figura 3: Ensayo de Colonización libre (A-D) y Colonización Inducida (E-G). A: Jaulas en las que fue realizado el ensayo de Colonización Libre. B, C y D: Tres plantas fuente de CPsV con colonias de *T. citricida*. E: plantines MV con brotes cubiertos por bolsas plásticas. F y G: detalles de los áfidos (flechas blancas) en el brote.

Posteriormente los plantines de MV utilizados en ambos experimentos fueron evaluados por IB sin observarse síntomas de psorosis a lo largo del ensayo. Al cabo de 4 años de observación de estos plantines, ninguno desarrolló síntomas de la enfermedad ni se detectó CPsV mediante RT-PCR en hojas de los plantines ni en las muestras de áfidos (*pooles* de 80-100 individuos) tomadas durante el desarrollo de ambos ensayos. A su vez, estos ensayos fueron repetidos manteniendo la metodología y sólo cambiando el período de inoculación de 30 días a 6 y 12 meses. Nuevamente, no se detectó presencia de CPsV en plantines ni en áfidos. Los autores concluyen que bajo estas condiciones *T. citricida* no es capaz de transmitir ni adquirir CPsV, pero no confirman si el resultado negativo de la transmisión es debido a que los áfidos no son capaces de adquirir el virus.

En conjunto todos estos ensayos sugieren un vector alado para CPsV que se encontraría entre alguna de las especies que colonizan cítricos infectados en el campo. En base a estos resultados en esta tesis se llevaron a cabo experimentos de Adquisición y Transmisión de CPsV con *T. citricida*, *Aphis spiraecola* y *Aphis gossypii* bajo condiciones controladas y contando con el método de detección de CPsV por RT-qPCR, que es específico y de alta sensibilidad para determinar la presencia del virus tanto en los áfidos como en los plantines del ensayo.

## 4.1.2 Biología de áfidos

Los insectos son los vectores de transmisión natural más frecuentes de virus que infectan plantas y dentro de ellos los áfidos son responsables de alrededor del 50% de estas transmisiones (Brunt *et al.*, 1996; Nault, 1997).

Los áfidos son insectos pequeños, de no más de 10 mm de largo, que se alimentan del contenido floemático de plantas vasculares introduciendo parte de su sistema digestivo dentro de las células del floema (Stern, 2006) (Figura 4).

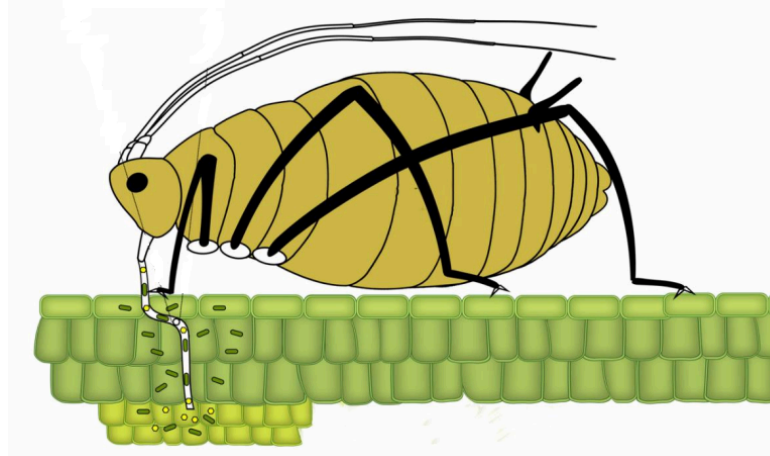


Figura 4: Esquema de un áfido introduciendo su estilete en el floema de una planta vascular (células verde claro). Modificado de Whitfield *et al.*, 2015.

Los áfidos revisan la superficie de la planta aceptada como potencial hospedadora con la punta de su proboscis, que posee receptores táctiles y responden a texturas, lo que a su vez les permite percibir el contorno de las nervaduras de las hojas, que es su sitio de alimentación preferido (Tjallingii, 1978a y b).

Luego introducen sus estiletes mandibulares y maxilares (Figura 5) dentro de la planta. Secretan continuamente una solución viscosa que contiene lipoproteínas y fosfolípidos que recubre el estilete a medida que éste penetra el tejido de la planta. Esta secreción se gelifica inmediatamente al retirarse el estilete, lo que la vuelve relativamente impermeable (Miles, 1987). Esta cubierta le otorga algo de rigidez al estilete, que es muy flexible, y permite que el áfido controle la dirección de movimiento del mismo (Pollard, 1973).

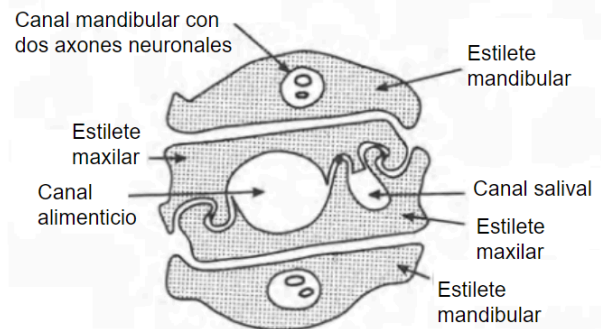


Figura 5: Esquema de una sección transversal del estilete de un áfido. Modificado de Dixon, 1985.

Los áfidos se alimentan y reproducen simultáneamente, sin retirar su estilete del floema del cual se están alimentando (Stern, 2006). Las crías se establecen cerca de sus madres, produciendo colonias muy numerosas.

A lo largo de su vida, estos insectos sufren un proceso denominado ecdisis, que consiste en la muda de su capa más externa de quitina. Esto ocurre cuatro veces durante su estadio de ninfa, antes de alcanzar su adultez. La cutícula de quitina es rígida, y no permite el crecimiento del animal, por lo que es recambiada periódicamente (Figura 6).

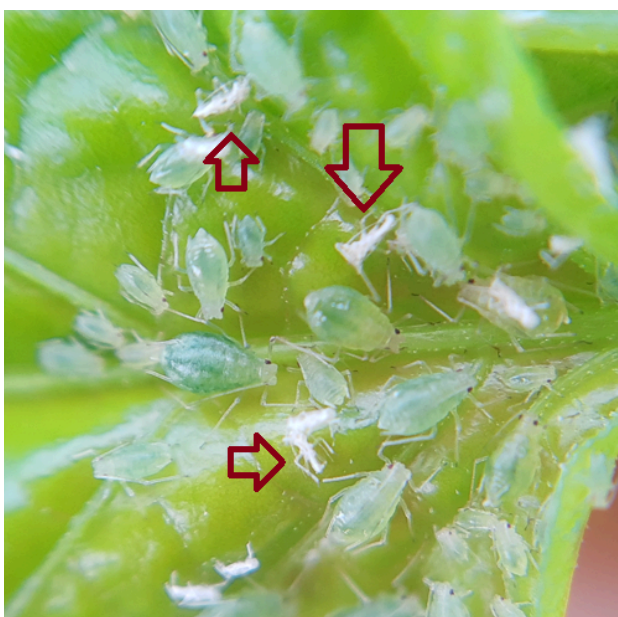


Figura 6: *Aphis gossypii* en hojas de *Solanum lycopersicum*. Mudas desprendidas de los áfidos señaladas con flechas rojas. Fotografía propia.

El tiempo de desarrollo de estos animales depende de la temperatura. A 20°C el estadio de ninfa tiene una duración de 6 a 8 días, y una longevidad total de unos 28 días. El tiempo generacional promedio es de 11 días (Komazaki, 1982). Es importante tener en cuenta que en los ensayos de adquisición y transmisión de esta tesis se utilizaron colonias de áfidos, es decir, se utilizaron grupos de áfidos que contenían individuos en todos los estadios del ciclo de vida.

Como se ha mencionado, los áfidos se alimentan del floema que contiene altas concentraciones de azúcares simples, lo que hace que esta solución presente una alta concentración osmótica. El sistema digestivo de los áfidos les permite alimentarse del



contenido floemático sin ser deshidratados por su alto potencial osmótico, sintetizando oligosacáridos de cadena larga a partir de los azúcares simples. Luego, los áfidos excretan el agua en exceso en forma de solución diluída de azúcares simples. Es por esto que el insecto puede pasar toda su vida sin moverse del lugar del que se encuentra alimentándose.

La mayoría de los áfidos nacen con embriones en desarrollo en su interior y engendran hembras sin ser fertilizadas por un macho. Esto es el resultado de una meiosis modificada que se saltea el paso de reducción al dividirse y resulta en heterocigotas diploides. Los embriones completan el desarrollo dentro del ovario de la madre secuencialmente, uno después de otro. Los embriones en desarrollo contienen a su vez embriones en desarrollo en su interior. En algunas especies aproximadamente una vez al año los áfidos se reproducen de manera sexual; las hembras sexuales tienen el mismo aspecto físico que las hembras asexuales, pero sus ovarios producen óvulos en lugar de embriones. Los machos surgen de una meiosis asexual en la que se pierde un cromosoma X (Stern, 2006).

Todas las especies de áfidos estudiadas poseen la capacidad de desarrollar alas en función de cambios en su ambiente (Figura 7). La mayoría de los individuos se desarrollan sin alas, pero a medida que las colonias crecen algunos individuos adultos producen alas para movilizarse a otras plantas, o bien a otra parte de la planta más conveniente para su alimentación (Stern, 2006).

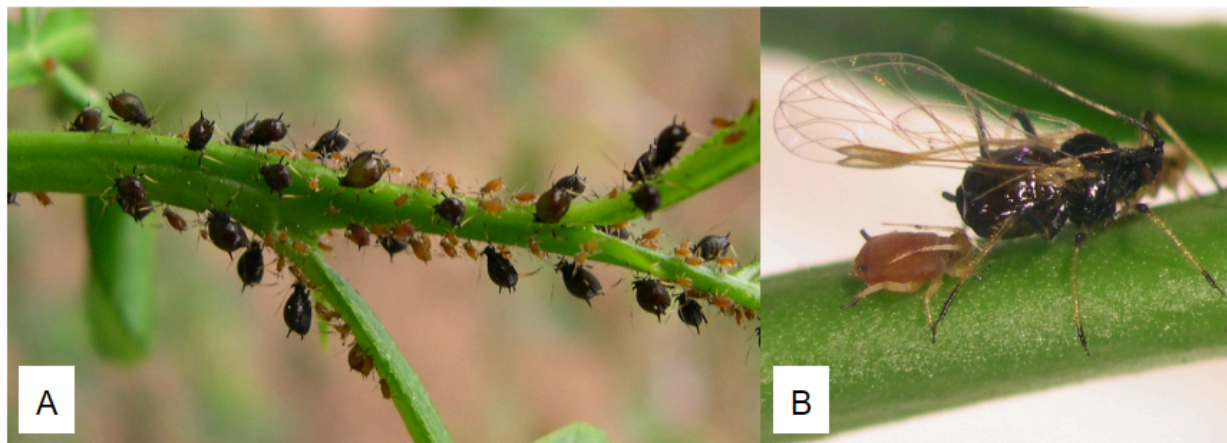


Figura 7: A: ninfas (marrones) y adultos no alados (negros) de *T. citricida* en brotes de *P. trifoliata*. B: Ninfa (marrón) y adulto alado (negro) de *T. citricida*. Imágenes cedidas por el Dr. Juan Pedro Bouvet (EEA-INTA Concordia, Entre Ríos).

La biología de estos animales los hace sumamente eficientes en su rol como vectores. Las bocas picosutoras facilitan la transmisión de viriones directamente dentro de las células sin causar daños irreparables a la planta. Al tener la posibilidad de reproducirse asexualmente, las poblaciones de áfidos pueden crecer con vertiginosa velocidad, aumentando las posibilidades de transmisión de virus. Además, muchas especies son polífagas, es decir, se alimentan de un amplio rango de especies vegetales, lo que es importante para la diseminación de virus que infectan a más de una especie.

Existen más de 200 especies identificadas como vectores distribuidas por todo el mundo (Brunt *et al.*, 1996; Eastop, 1983; Hull, 2002; Nault, 1997, Stevens & Lacomme, 2017; Gaafar *et al.*, 2020; Jayasinghe *et al.*, 2021), y sus mecanismos moleculares de transmisión son muy variables.

#### 4.1.2.1 Mecanismos de transmisión de virus por insectos

La transmisión de virus de plantas consiste en un proceso de tres pasos: la adquisición por parte del vector al alimentarse de una planta infectada, la retención de los viriones adquiridos en el sitio de retención y la liberación de viriones retenidos, también llamada inoculación. En función del movimiento del virus dentro del insecto se clasifican en transmisión circulativa (persistente, puede ser propagativa o no), y no circulativa (persistente y semi persistente). Un áfido que haya adquirido virus y sea capaz de transmitirlo a una planta sana se denomina virulífero.

##### Transmisión circulativa o persistente

Los virus atraviesan las membranas del sistema digestivo del áfido, son transportadas a la hemolinfa, ingresan a las glándulas salivares y finalmente se liberan del áfido a través de su saliva (Figura 8, flechas negras).

La transmisión circulativa se clasifica a su vez en propagativa, cuando el virus es capaz de replicarse dentro del insecto, y no propagativa, cuando el virus no se replica en el cuerpo del insecto. Los áfidos permanecen virulíferos (capaces de inocular el virus adquirido) durante semanas e incluso después de que el insecto haya mudado su cutícula (Ng y Perry, 2004).

### Transmisión no circulativa: semi persistente y no persistente

En este caso, los virus presentan una relación más superficial y transitoria con el vector y sólo se asocian a la boca y el estomodeo (Figura 8, zonas sombreadas en gris). La mayoría de los virus transmitidos por áfidos lo hacen en forma no circulativa.

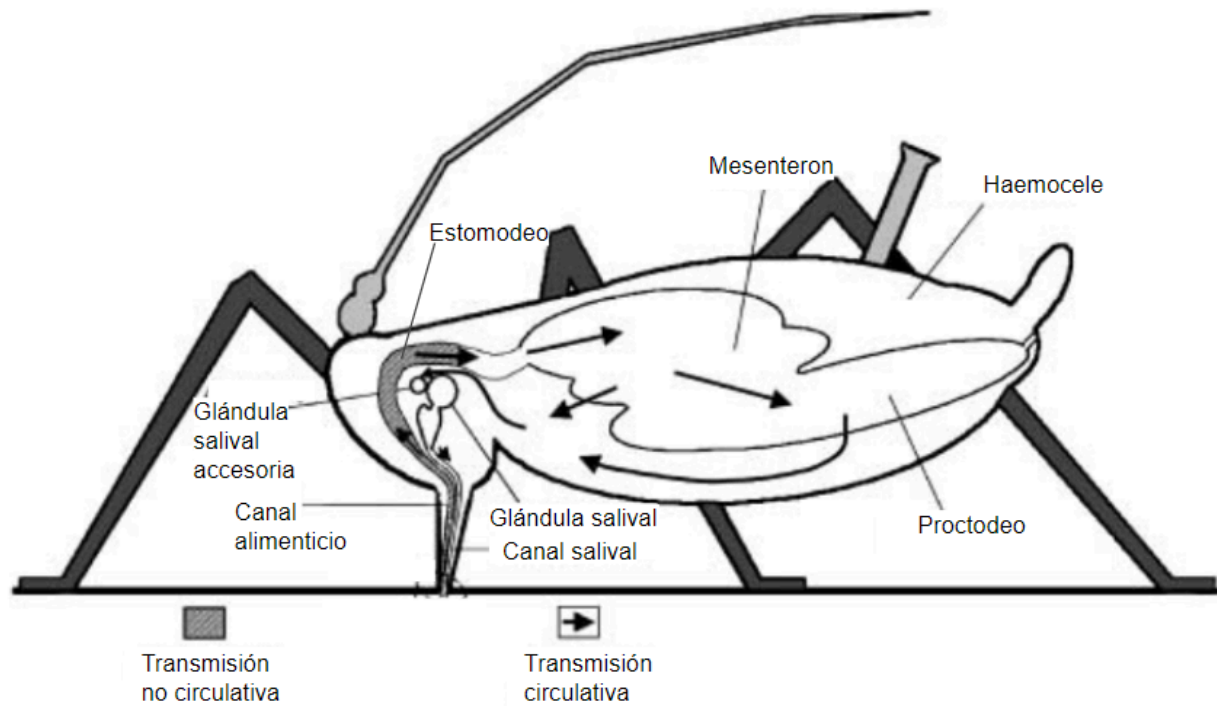


Figura 8: Esquema de una sección transversal de un áfido señalando la ruta tomada por virus circulativos y no circulativos luego de la adquisición por parte del insecto. Los fluidos de la planta ingresan por el canal alimenticio dentro del estilete. El canal alimenticio y el estomodeo son los sitios de retención para virus transmitidos de manera no circulativa. Las flechas señalan el paso de virus transmitidos de manera circulativa, que ingresan por el canal alimenticio y atraviesan sus membranas hasta alcanzar el haemocele y glándulas salivales accesorias antes de liberarse a través del conducto salival (Modificado de Ng y Perry, 2004).

Es importante destacar que las partes del sistema digestivo mencionadas (boca y estomodeo) se recambian y pierden periódicamente junto con todo lo que se encuentre fijado en su superficie (como podrían ser virus asociados a ella) durante el proceso de ecdisis. Este proceso ocurre en todos los insectos y artrópodos durante su crecimiento. En áfidos la ecdisis ocurre durante los estadios de ninfa. Los áfidos adultos no mudan su cutícula (Ng y Perry, 2004).

La transmisión no circulativa puede clasificarse a su vez en no persistente ó semi persistente. La transmisión no persistente es caracterizada por tiempos muy cortos de adquisición e inoculación, que pueden ser de segundos a minutos, y los áfidos permanecen virulíferos durante tiempos relativamente cortos. Una vez que el áfido abandona la planta fuente de virus y comienza a alimentarse de una planta no infectada su capacidad de transmitir el virus es sólo de algunos minutos (Pirone y Perry, 2002; Jayasinghe *et al.*, 2021; Ng & Zhou, 2015).

La transmisión semi persistente tiene tiempos de adquisición de minutos a horas y permanecen virulíferos durante unos pocos días (Palacios *et al.*, 2002; Ng & Zhou, 2015).

## 4.2 Transmisión de citrus tristeza virus por *T. citricida*

Citrus tristeza es una enfermedad endémica de la región mesopotámica argentina. Su agente causal es citrus tristeza virus (CTV) y su vector natural es *T. citricida*. Ambos se encuentran presentes en la zona citrícola argentina (Roistacher y Bar-Joseph, 1987). El mecanismo de transmisión de este virus se encuentra muy estudiado y se sabe que la retención por parte del áfido es no persistente, ocurre en el estilete e involucra una de las proteínas de cubierta del virus (Shilts *et al.*, 2020). Este vector es muy eficiente, encontrándose tasas de transmisión de más del 80% (Roistacher y Bar-Joseph, 1987). Es por estas características, y principalmente el hecho de que se trate de un mecanismo no persistente, que este sistema virus-vector se utilizó como control positivo en los ensayos de adquisición de CPsV por *T. citricida* en este trabajo de tesis

## 4.3 Objetivos

4.3.1 Determinar si CPsV es adquirido por las especies *Toxoptera citricida*, *Aphis spiraecola* y/o *Aphis gossypii*

4.3.2 Determinar si CPsV es transmitido por las especies *Toxoptera citricida*, *Aphis spiraecola* y/o *Aphis gossypii*.

## 4.4 Hipótesis

4.4.1 La especie de áfido *Toxoptera citricida* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas

4.4.2 La especie de áfido *Aphis gossypii* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas.

4.4.3 La especie de áfido *Aphis spiraecola* es capaz de adquirir CPsV bajo condiciones controladas.

4.4.4 La especie de áfido *Toxoptera citricida* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

4.4.5 La especie de áfido *Aphis gossypii* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

4.4.6 La especie de áfido *Aphis spiraecola* es capaz de transmitir CPsV a cítricos sanos bajo condiciones controladas.

## 4.5 Resultados

### 4.5.1 Selección y recolección de áfidos

Las especies de áfidos recolectadas para realizar los ensayos de adquisición y transmisión en este trabajo de tesis fueron seleccionadas en función de la abundancia con que se encuentran en la región de Concordia, Entre Ríos. La recolección se hizo durante el mes de Agosto de 2021, que es la época de mayor abundancia de áfidos en el campo. Para eso se contó con la colaboración del Dr. Pedro Bouvet, de la EEA-INTA Concordia.

### 4.5.2 Identificación y saneamiento de las especies de áfidos recolectadas

A partir de la guía “Los Pulgones de los Cítricos” (1996) de Hermoso de Mendoza (Figura 9) y con la colaboración del Dr. Juan Pedro Bouvet se realizó el reconocimiento morfológico de las especies observadas en plantas de cítricos a campo, y en base a esto su selección, recolección y saneamiento.



Foto 1.- *Aphis craccivora*:  
adulta áptera



Foto 2.- *Aphis fabae*:  
adulta áptera y ninfas



Foto 3.- *Toxoptera aurantii*:  
ala anterior



Foto 4.- *Toxoptera aurantii*:  
adulta áptera



Foto 5.- *Aphis gossypii*:  
ala anterior

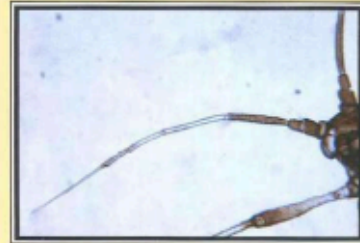


Foto 6.- *Toxoptera citricida*:  
antena de adulta alada



Foto 7.- *Aphis gossypii*:  
adulta áptera



Foto 8.- *Aphis gossypii*:  
adultas ápteras



Foto 9.- *Macrosiphum euphorbiae*:  
adulta áptera



Foto 10.- *Brachycaudus helichrysi*:  
adulta áptera



Foto 11.- *Myzus persicae*:  
adulta áptera



Foto 12.- *Aphis spiraeicola*:  
adulta áptera

Figura 9: Guía para la identificación visual de áfidos que se alimentan de cítricos. Tomada de Hermoso de Mendoza, 1996.

Se observó multitud de especies colonizando árboles cítricos a campo y se seleccionaron las dos especies más abundantes al momento de la recolección, que fueron *A. spiraecola* y *T. citricida*. Esto es coincidente con lo observado por Beñatena y Portillo (1984) y Maeso *et al.* (2000).

Las colonias utilizadas en los ensayos realizados en esta tesis fueron sometidas a un proceso de saneamiento realizado en la EEA-INTA Concordia, Entre Ríos. Este consistió en criar las colonias durante 3 generaciones alimentándolas exclusivamente con cítricos certificados libres de enfermedades. Para esto se usaron jaulas cubiertas de mallas anti áfidos y se colocaron en cámaras aisladas bajo condiciones de temperatura controladas de  $24\pm 2$  °C y fotoperíodo de 10:14 – L:O (Figura 10).

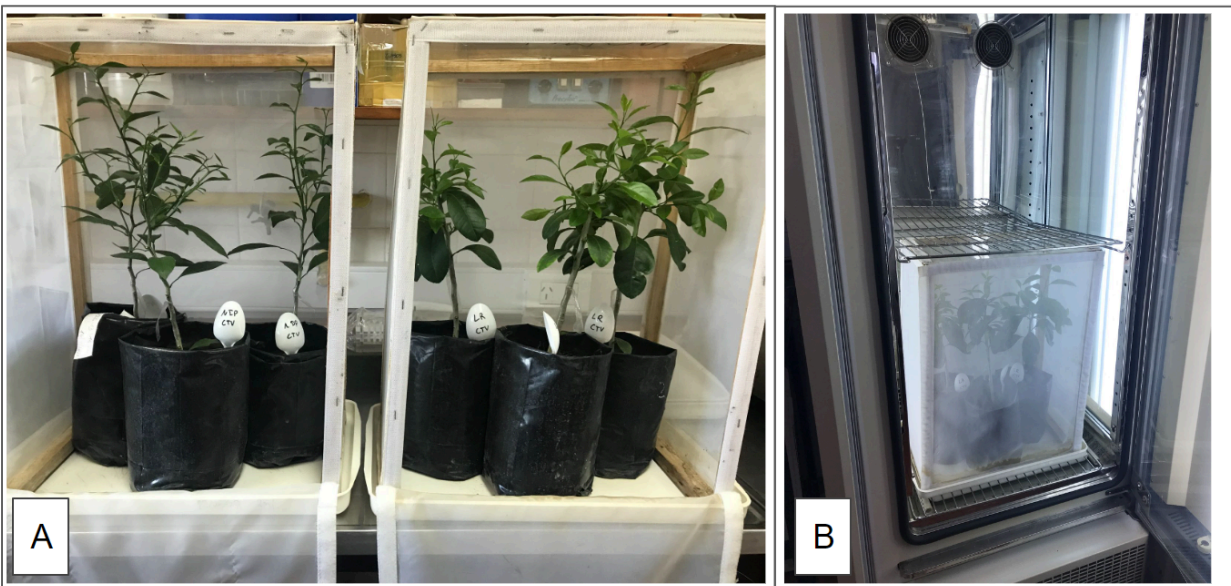


Figura 10: A) Jaulas cubiertas de mallas anti áfidos con tres plantas NDP (jaula izquierda) y tres LR (jaula derecha). B) Jaulas en cámara de cultivo bajo condiciones de temperatura y luz controladas.

#### 4.5.2.1 Metodología para la recolección de áfidos durante los ensayos

Debido al proceso de ecdisis y a que se desconoce el tipo de transmisión de este posible vector, se analizaron adultos y ninfas por separado. Las ninfas de *T. citricida* mudan su cutícula 4 veces durante su desarrollo, mientras que los adultos no sufren este proceso. De tratarse de transmisión no circulativa el virus se adheriría al estilete o



al estomodeo y se perdería junto con la muda, disminuyendo la tasa de adquisición en ninfas con respecto a los adultos. Es por esto que la detección de CPsV fue realizada partiendo de RNA total de *pooles* de áfidos de 5 adultos o bien de 10 ninfas.

Recordando que el insecto introduce su estilete en el tejido vascular de la planta para alimentarse, si se los retira cuando se están alimentando parte del sistema digestivo podría dañarse o cortarse y quedar dentro del tejido vegetal. Si los viriones estuvieran retenidos en esta parte del sistema digestivo, estos se perderían sin detectarse en el cuerpo del áfido. Es por esto que en todos los ensayos los áfidos fueron recolectados de la manera de evitar la pérdida de parte del sistema digestivo. Para eso se procedió como se describe a continuación.

Cuando el brote de donde se alimentan los áfidos es separado del resto de la planta el contenido del floema deja de circular, lo que hace que los áfidos comiencen a moverse buscando una nueva fuente de alimento. Las muestras de áfidos fueron tomadas cortando los brotes que tenían insectos alimentándose en su superficie y colocando este material vegetal en placas de petri. También se instigó a los áfidos a apartarse de la planta mediante toques suaves con pinza o aguja hasta que éstos comenzaron a caminar por la superficie de la hoja y/o de la placa de petri (Figura 11). Aquellos que se separaron de la planta fueron levantados con pincel o pinzas y colocados en un eppendorf con 100uL de TRI-Reagent® e inmediatamente molidos con un pilón. Este macerado se mantuvo a -20°C hasta completar la extracción de RNA total.

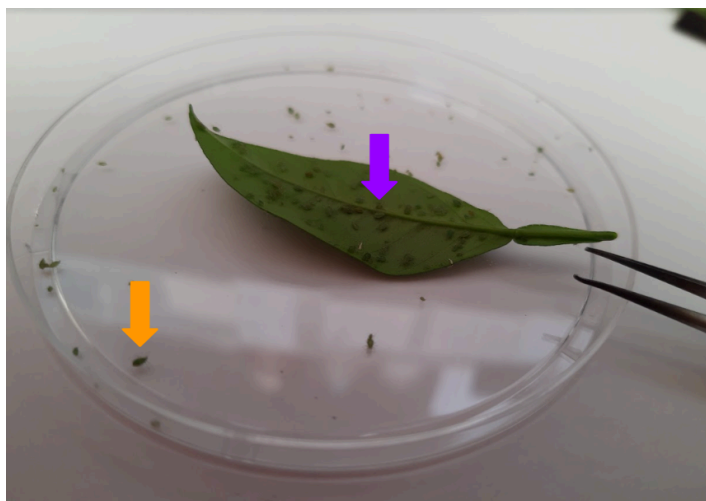


Figura 11: Hoja joven de NDP en placa de petri con *A. gossypii*. Se puede observar que algunos individuos aún se encuentran sobre la hoja alimentándose (flecha violeta) y que otros individuos han abandonado la hoja, caminando sobre la placa (flecha naranja).

#### 4.5.2.2 Integridad del RNA total de áfidos y optimización de la RT-PCR para verificar su calidad

En todos los ensayos de adquisición la detección de CPsV se realiza en las muestras de RNA total extraído de *pooles* de áfidos. Para verificar la integridad y calidad del RNA en estos extractos se realizaron electroforesis y luego RT-PCRs utilizando cebadores que hibridan en un gen de expresión estable en áfidos (Shang *et al.*, 2015). Para corroborar la integridad se sembró una alícuota del extracto de RNA total y se visualizó en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio y retroiluminación por UV. Se observaron las bandas correspondientes al RNA ribosomal 28s y 16s, indicando que la extracción de RNA total fue satisfactoria (Figura 12).

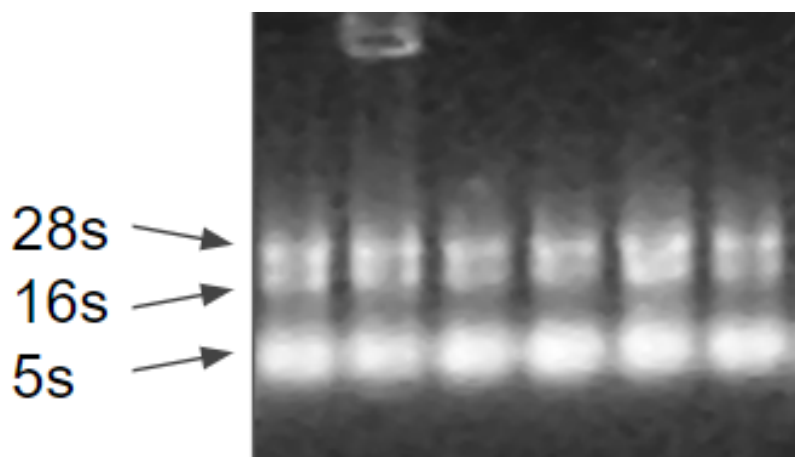


Figura 12: Electroforesis nativa en gel de agarosa 1% de diferentes extractos de RNA total de áfidos.

Luego de verificar la integridad del RNA total y de determinar aproximadamente su concentración (descrito en el Capítulo Materiales y Métodos) se procedió a la amplificación de un fragmento de DNA de los áfidos que servirá como control del estado de las muestras en los ensayos de adquisición y transmisión de CPsV en muestras de áfidos. Para eso se sintetizó cDNA utilizando los cebadores EF1 $\alpha$  que hibridan en la secuencia del factor  $\alpha$  de elongación de traducción de proteínas de *T. citricida* (Shang *et al.*, 2015). Se realizó una búsqueda por BLAST en la base de datos de NCBI de estos cebadores y se confirmó que la secuencia se halla tanto en *T. citricida* como en *A. spiraecola* y *A. gossypii*. A partir de este cDNA se realizó una PCR con los mismos cebadores, cuya reacción produce un fragmento de DNA de 194 pb. En

la Figura 13 se muestra a modo de ejemplo el producto de esta PCR a partir de cinco *pooles* de áfidos.

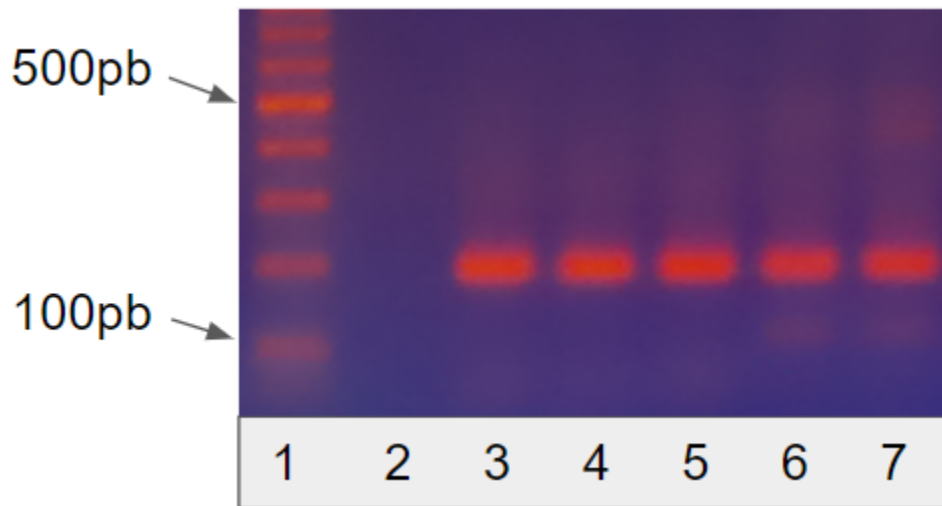


Figura 13: Electroforesis de los productos de PCR EF1 $\alpha$ , control de integridad del RNA de áfidos a partir de: Calle 1: marcador. Calle 2: control negativo sin cDNA. cDNA sintetizado a partir de RNA de *pooles* de: calle 3: adultos no alados de *T. citricida*; calle 4: ninfas de *T. citricida*; calle 5: adultos alados de *A. gossypii*; calle 6: adultos no alados de *A. gossypii*; calle 7: ninfas de *A. gossypii*.

Por otro lado, para verificar que las colonias saneadas efectivamente se encontraban libres de CPsV se analizaron *pooles* de áfidos saneados de la manera descrita. Todas las detecciones de CPsV por RT-qPCR resultaron negativas, confirmando que estas colonias se encontraban libres de CPsV.

#### 4.5.3. Ensayos de adquisición de CPsV por áfidos

Los ensayos de adquisición en esta tesis fueron realizados de la siguiente manera: se tomaron colonias de áfidos saneadas cortando brotes de las plantas libres de enfermedades en las que éstos estuvieran alimentándose y se colocaron directamente sobre los brotes tiernos de las plantas infectadas con CPsV, denominadas plantas de

adquisición. Como ya se mencionó, los insectos dejan de alimentarse en cuanto el floema de la planta deja de circular y al proceder de esta manera los insectos se trasladan de una planta a otra sin dañarse físicamente. El esquema del procedimiento se muestra en la Figura 14.

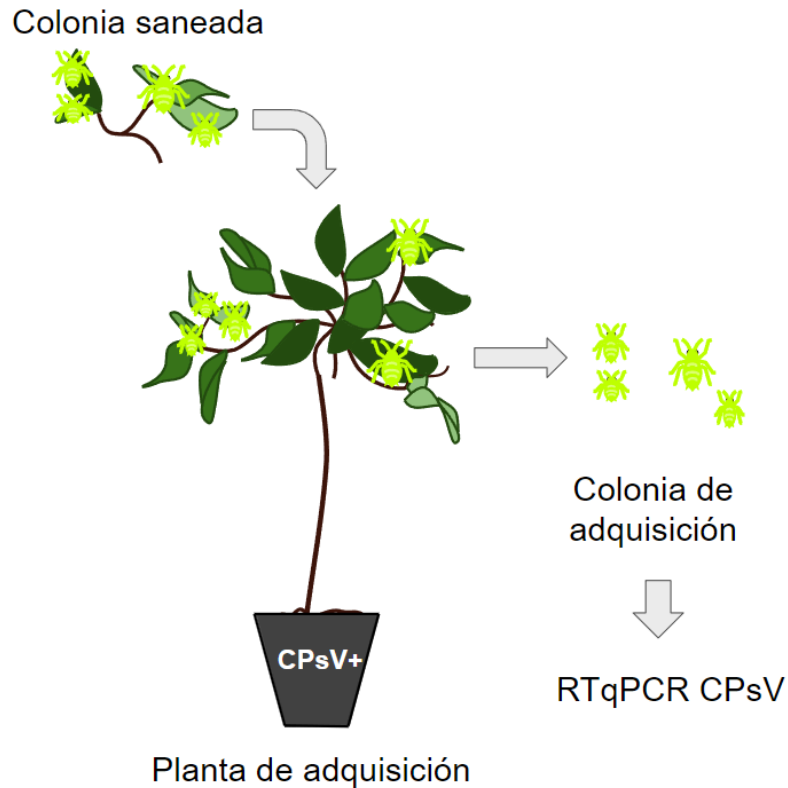


Figura 14: Esquema del procedimiento de los ensayos de adquisición. Se toma una colonia de áfidos saneada y se transfiere a una planta infectada con CPsV cortando el brote en el que se encuentran los áfidos y colocándolo sobre los brotes tiernos de la planta infectada. Luego de transcurrido un cierto tiempo (tiempo de adquisición) se toman muestras de la colonia y se evalúa la presencia de CPsV en estos áfidos mediante RTqPCR.

#### 4.5.3.1 Ensayo 1: Adquisición de CPsV por *T. citricida* y *A. spiraecola* en NDP

El objetivo de estos ensayos fue evaluar la capacidad de los áfidos recolectados y saneados para adquirir CPsV al alimentarse de NDPs infectados con CPsV 90-1-1 (PsA). Se procedió de la manera descrita colocando los brotes conteniendo las colonias

saneadas directamente sobre los brotes tiernos de la planta infectada (Figura 15) y permitiendo que los áfidos se trasladen libremente. Las plantas con sus respectivas colonias de áfidos fueron mantenidas en cámaras con un fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$



Figura 15: brotes de NDP libre de virus con cientos de individuos de *T. citricida*, colocados sobre las ramas de un NDP infectado con CPsV 90-1-1.

Se realizaron 3 ensayos consecutivos con *T. citricida* en los que se analizaron 80, 100 y 225 individuos adultos, y en paralelo un ensayo con 25 individuos adultos de *A. spiraecola*. El tiempo de adquisición de estos ensayos fue de 24 horas y la detección de CPsV se realizó mediante la técnica de RT-qPCR descrita en el Capítulo Materiales y Métodos con los cebadores ihpCP1 e ihpCP3 a partir de los extractos de RNA total de *pools* de áfidos.

En este ensayo no se detectó CPsV en ninguna de las muestras. Si la tasa de adquisición fuera menor al 1% el número de individuos debería ser un orden mayor al analizado en este ensayo para poder detectar el virus. Para el caso de *A. spiraecola* no se contó con una nueva colonia con suficiente cantidad de individuos, por lo que el ensayo no pudo repetirse para esta especie.

#### 4.5.3.2 Ensayo control de adquisición de CTV por *T. citricida* en NDP y LR

Teniendo en cuenta que varios factores podrían haber alterado el resultado negativo del primer ensayo de adquisición de CPsV, se modificó el diseño de los siguientes experimentos. Así, se partió de un mayor número de individuos y los tiempos de adquisición fueron más largos, y además se agregó un ensayo control positivo de adquisición.

El ensayo control tiene como objetivo verificar el estado de las colonias de *Toxoptera citricida*, sobrevivencia de los insectos, su capacidad para alimentarse, método de traslado y el tiempo mínimo necesario para la adquisición control. Por lo tanto en paralelo al Ensayo 1 de adquisición de CPsV se realizó un ensayo denominado Control.

Para este ensayo control se utilizaron 6 plantas infectadas con el aislamiento CTV 126-13 (germoplasma de la EEA-INTA Concordia, Entre Ríos, ya confirmada su infección por RT-PCR), 3 NDP y 3 LR. Se evaluaron los tiempos de adquisición de 24 hs y 48 hs tomando muestras de áfidos de las mismas plantas. Las plantas con sus respectivas colonias de áfidos fueron mantenidas en cámaras bajo las mismas condiciones que las utilizadas en el Ensayo de adquisición 1 de CPsV: un fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se tomaron las muestras en *pooles* de 10 ninfas ó 5 adultos ápteros por tubo. En la Tabla 1 se detalla el número de individuos analizados en este ensayo Control.

Tabla 1: Total de áfidos analizados en el ensayo Control de adquisición de CTV, a: adultos, n: ninfas.

Tiempo de adquisición	Total de áfidos en LR	Total de áfidos en NDP
24h	190 (70a + 120n)	210 (90a + 120n)
48h	125 (35a + 90n)	125 (35a + 90n)

Al analizar la presencia de CTV por RT-PCR en este ensayo control se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2: Detección de CTV en *pooles* de *T. citricida* colonizando NDP y LR infectados con CTV. A: adultos, N: ninfas, T: totales.

	24h adquisición		48h adquisición	
	A/T	N/T	A/T	N/T
LR	10/14	7/12	4/7	5/9
(%)	(71,4%)	(58,3%)	(57,1%)	(55,5%)
NDP	6/18	6/12	3/7	7/9
(%)	(33,3%)	(50%)	(42,8%)	(77,7%)

Estos resultados muestran una adquisición entre 55 y 78% para ninfas y 33 y 71% para adultos. Estos valores se encuentran dentro de lo esperado para la adquisición de CTV por parte de *T. citricida*. La tasa de adquisición siempre será mayor o igual a la de transmisión y los antecedentes bibliográficos reportan que la tasa de transmisión para este sistema virus-vector es altamente variable. Liu *et al.* (2019) reportan tasas de transmisión que varían entre 90 y 100% a partir de un tiempo de adquisición mínimo de 6 horas en naranjo dulce Jincheng (*C. sinensis* L.). Por esto podemos confiar en que las condiciones del experimento y el estado de las colonias y las plantas fueron adecuadas para la adquisición.

#### 4.5.3.3 Ensayo 2 de Adquisición de CPsV por *T. citricida* en LR y NDP

En paralelo con el ensayo control y a partir de la misma colonia saneada de *T. citricida* se realizaron los ensayos 2 y 3 para CPsV.

En el Ensayo 2 se utilizaron 6 plantas infectadas con CPsV 90-1-1; 3 NDP y 3 LR. Se evaluaron tres tiempos de adquisición: 24h, 48h y 22 días tomando muestras de áfidos de las mismas plantas a las 24 hs, 48 hs ó 22 días de iniciado el experimento, respectivamente. Las plantas con sus respectivas colonias de áfidos fueron mantenidas

en cámaras con un fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ . El experimento se encuentra esquematizado en la Figura 16:

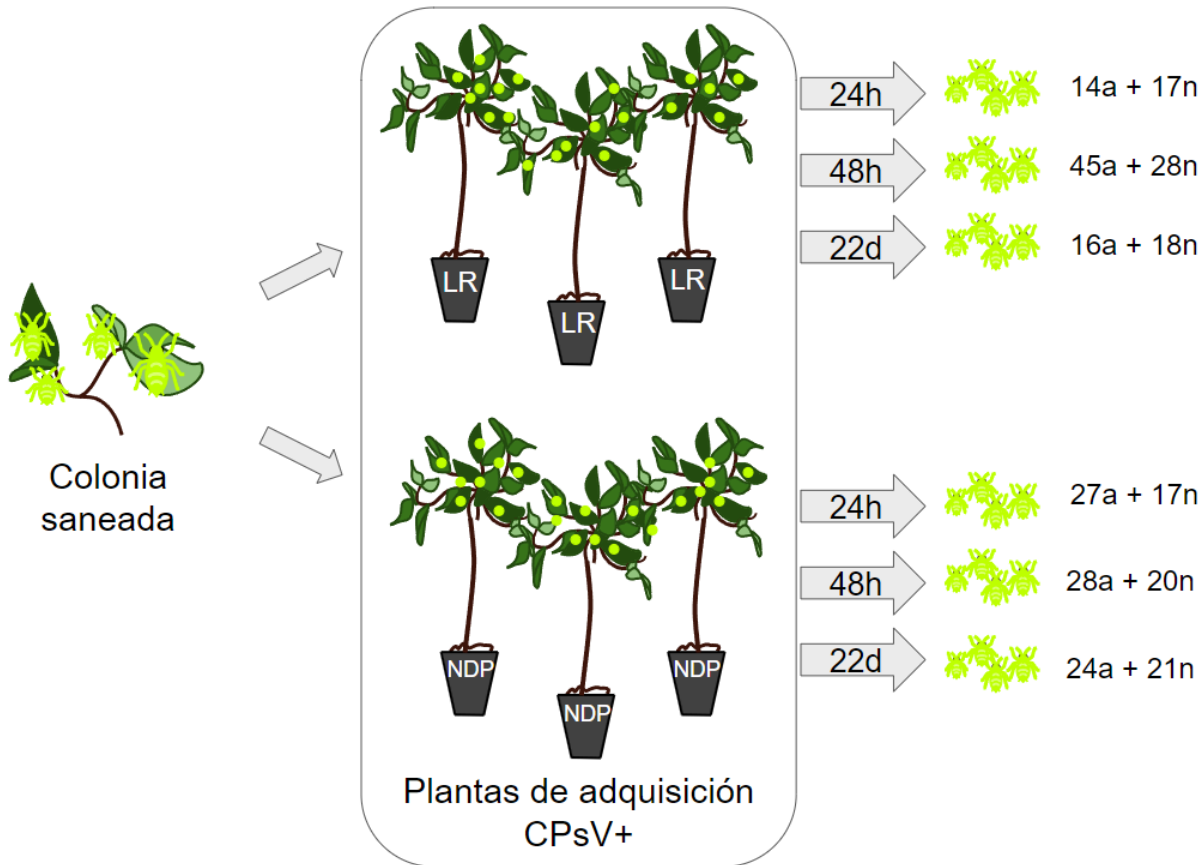


Figura 16: Esquema del ensayo 2 de adquisición de CPsV por *T. citricida* en LR y NDP. Los números corresponden al total de *pools* analizados, a: adultos (5 individuos por *pool*), n: ninfas (10 individuos por *pool*).

Como control negativo se colocaron colonias de áfidos saneados sobre un NDP y un LR libres de virus. La detección de CPsV fue realizada mediante RT-qPCR y la presencia del mRNA del gen eF1 $\alpha$  se evaluó por RT-PCR, como control de la integridad y calidad del RNA total.

El total de áfidos analizados en este ensayo se muestra en la Tabla 4:



Tabla 4: Total de áfidos evaluados en el Ensayo 2 de adquisición de CPsV por *T. citricida*.

Tiempo de adquisición	Áfidos LR	Áfidos NDP
24h	240 (70a + 170n)	305 (135a + 170n)
48h	505 (225a + 280n)	340 (140a + 200n)
22d	260 (80a + 180n)	330 (120a + 210n)

En este ensayo también se recolectaron las mudas encontradas sobre la superficie de las hojas, pero no se detectó CPsV en éstas muestras debido a la baja cantidad de RNA obtenida a partir de ellas.

No se detectó presencia de CPsV en los extractos de RNA total de *T. citricida* de ninguna de las muestras analizadas, independiente de la planta de adquisición, tiempo de adquisición y etapa de desarrollo del insecto.

#### 4.5.3.4 Ensayo 3 de Adquisición de CPsV por *T. citricida* en LR y NDP

Este ensayo fue realizado con plantas crecidas bajo las mismas condiciones que en el Ensayo 2. Se utilizó la misma colonia de *T. citricida* saneada, que fue mantenida en plantas libres de enfermedades durante el transcurso del Ensayo 1 de adquisición de CPsV. De igual manera, en este tercer ensayo se tomaron los áfidos que se encontraban en las plantas de NDP libres de virus cortando brotes sobre los que se estuvieran alimentando y colocándolos sobre los brotes jóvenes de las plantas de adquisición. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo con régimen de luz natural y temperatura controlada entre 20-35 °C.

El experimento se encuentra esquematizado en la Figura 17:

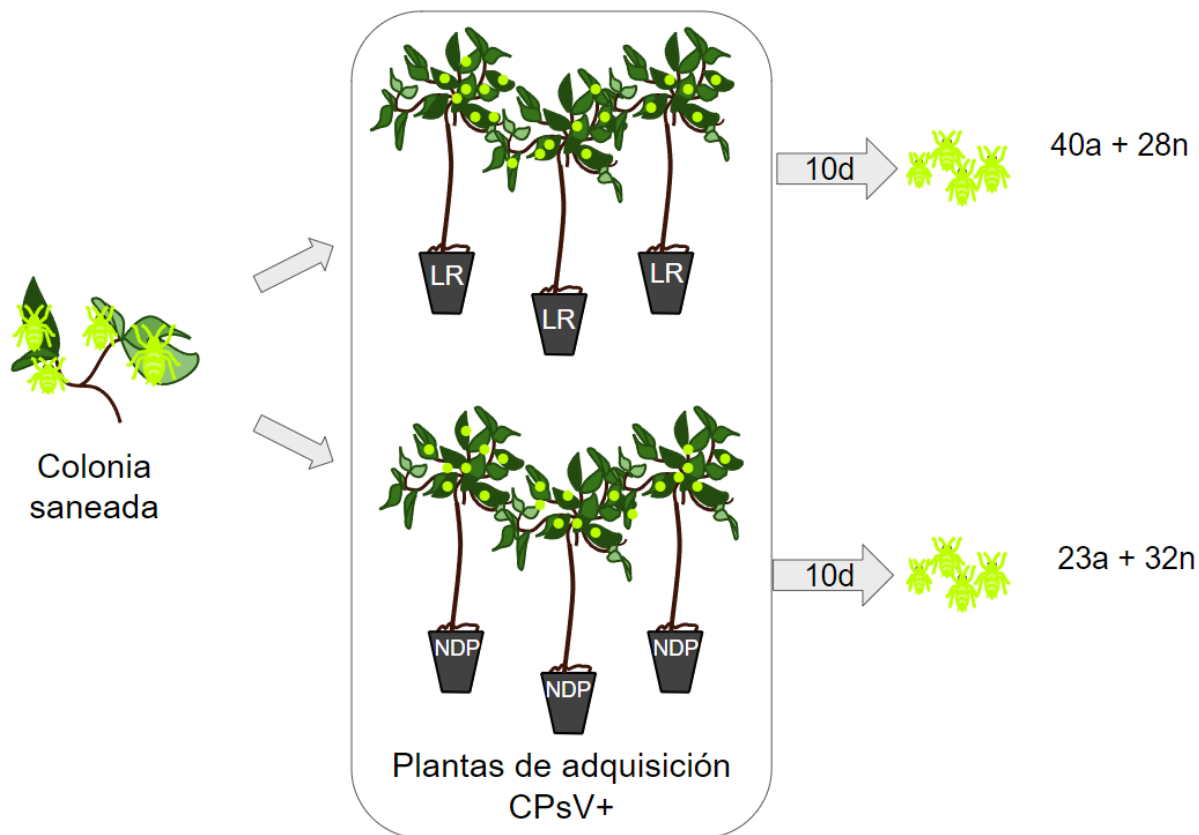


Figura 17: Esquema del ensayo 3 de adquisición de CPsV por *T. citricida* en LR y NDP. Los números corresponden al total de *pooles* tomados, a: adultos (5 individuos por *pool*), n: ninfas (10 individuos por *pool*).

Se utilizaron 3 LR y 3 NDP infectados con CPsV 90-1-1. El tiempo de adquisición de este ensayo fue de 10 días para permitir a los áfidos multiplicarse hasta alcanzar un número mayor de individuos. El total de áfidos analizados se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5: Total de áfidos evaluados en el ensayo 3 de adquisición de CPsV por parte de *T. citricida* en NDP y LR.

Tiempo de adquisición	Áfidos LR	Áfidos NDP
10d	480 (200a + 280n)	435 (115a + 320n)

Se detectó CPsV en un único extracto de RNA total, obtenido de un *pool* de 10 ninfas recolectadas de un LR. Si se considera que un único individuo fue capaz de adquirir CPsV, la tasa de adquisición en este ensayo sería del 0,35%.

#### 4.5.3.5 Ensayo 4 de Adquisición de CPsV por *A. gossypii*

Si bien *A. gossypii* es vector de CTV (Roistacher *et al.*, 1984), en este ensayo no se incluyó un control positivo como el descrito en la sección 4.5.3.2 debido a que no se contó con plantas infectadas con CTV al momento de realizarlo.

Se repitió el procedimiento con una colonia de *A. gossypii* saneada de la manera ya descrita. Para este ensayo se utilizaron para la adquisición 4 naranjas Valencia (*C. sinensis* Osbeck, de aquí en adelante NV) injertadas sobre *Poncirus trifoliata*, infectadas mediante injerto con CPsV 90-1-1. Nuevamente, se separaron áfidos adultos ápteros de ninfas y adultos alados realizándose *pooles* de 5 adultos alados, 5 adultos ápteros o bien 10 ninfas. También se tomaron muestras no sólo de los brotes jóvenes en la copa sino también de brotes jóvenes del pie (*P. trifoliata*). El tiempo de adquisición fue de 7 días y se determinó en función de la velocidad de multiplicación de los áfidos, realizándose la toma de muestras cuando se observó una abundante cantidad de áfidos en las plantas. El ensayo se encuentra esquematizado en la Figura 18, y el total de individuos evaluados se encuentra resumido en la Tabla 6.

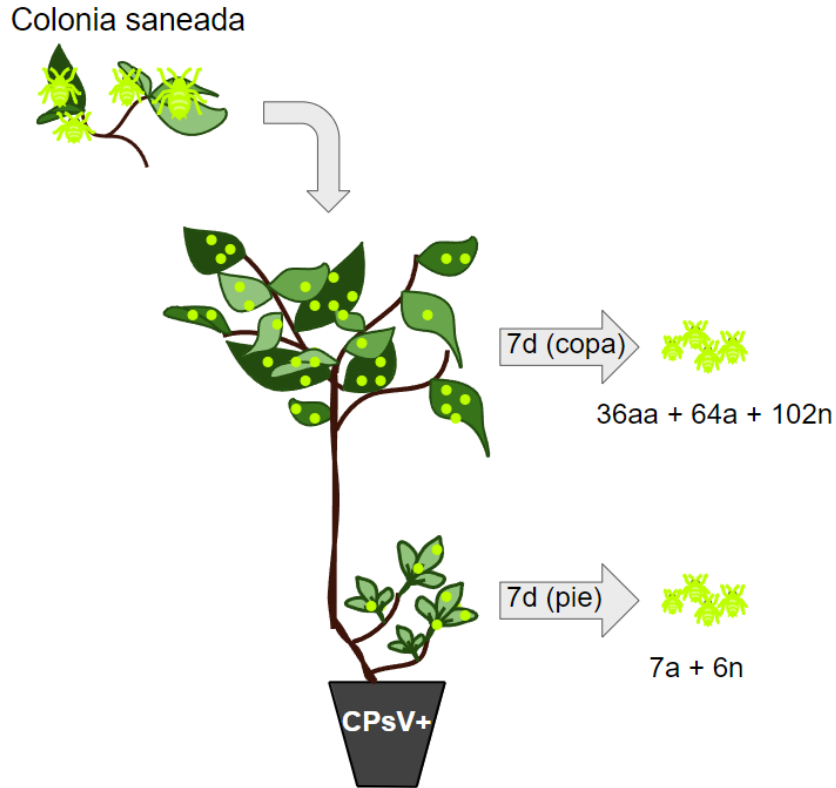


Figura 18: Esquema del ensayo de adquisición de CPsV por *A. gossypii* en NV (copa) sobre *P. trifoliata* (pie). Los números corresponden al total de *pooles* tomados, aa: adultos alados (5 individuos por *pool*) a: adultos (5 individuos por *pool*), n: ninfas (10 individuos por *pool*).

Tabla 6: Total de áfidos evaluados en el ensayo 3 de adquisición de CPsV por *A. gossypii* en NV sobre *P. trifoliata*.

T adq	Áfidos de la copa NV	Áfidos del pie <i>P. trifoliata</i>
7d	1520 (180aa + 320a + 1020n)	95 (35a + 60n)

No se detectó a CPsV en ninguno de los *pooles* de ninfas ni de adultos, tomados tanto de la copa como del pie.

#### 4.5.4 Ensayos de transmisión de CPsV por *T. citricida* y *A. gossypii*

Para realizar los ensayos de transmisión es necesario partir de una colonia de áfidos que haya adquirido el virus, llamada colonia de adquisición. Para estos ensayos se utilizaron los áfidos que se habían reproducido en las plantas de adquisición en los ensayos anteriores, permitiéndoles reestablecer colonias sobre las plantas infectadas para luego evaluar su capacidad para transmitir CPsV a plantas sanas bajo condiciones de temperatura controladas. El procedimiento se encuentra esquematizado en la Figura 19:

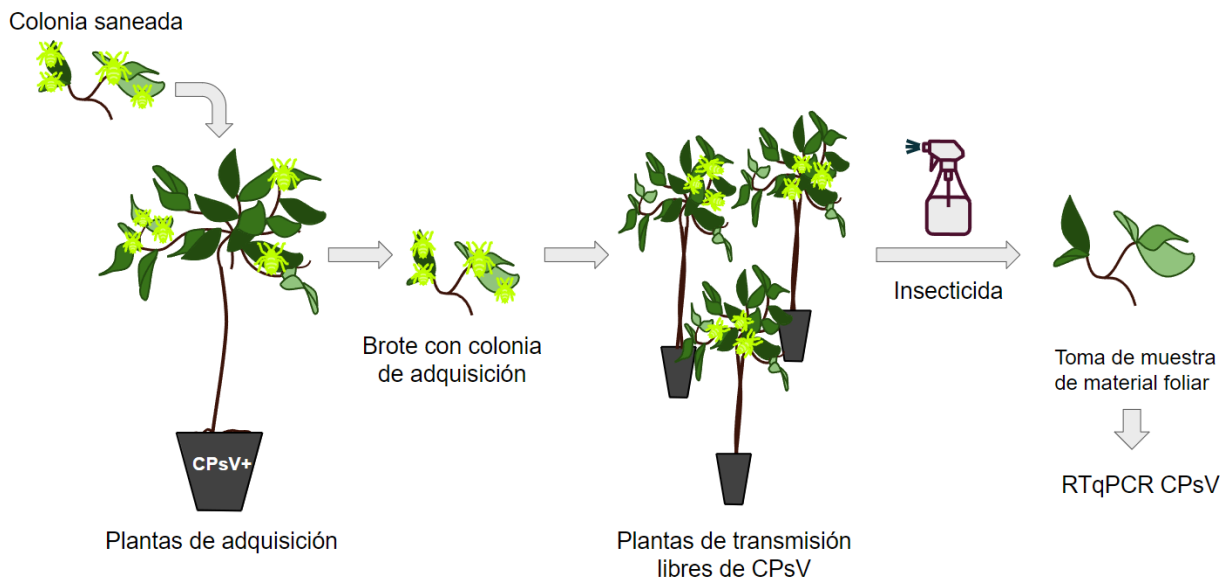


Figura 19: Esquema de los ensayos de transmisión. Se colocan brotes con colonias de adquisición sobre plantas libres de CPsV. Luego de un tiempo de inoculación se eliminan los áfidos utilizando insecticida comercial y se toman muestras de material foliar de las plantas de transmisión para evaluar la presencia de CPsV.

#### 4.5.4.1 Ensayo 1 de transmisión de CPsV por *T. citricida*

Como se muestra en la Figura 20, el ensayo fue realizado de la manera descrita anteriormente permitiendo a *T. citricida* alimentarse de plantas infectadas con CPsV durante 10 días, tomando brotes de las plantas infectadas conteniendo áfidos (colonia de adquisición) y colocando éstas sobre brotes jóvenes de plantas libres de enfermedades (plantas de transmisión). Se utilizaron para esto 3 NDPs, un LR y 2 NV sobre *P. trifoliata* libres de enfermedades. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo con régimen de luz natural y temperatura controlada entre 20-35 °C.

Se le permitió a los áfidos alimentarse durante 7 días de las plantas de transmisión y luego las plantas fueron fumigadas con MAMBORETÁ-D, un insecticida sistémico.

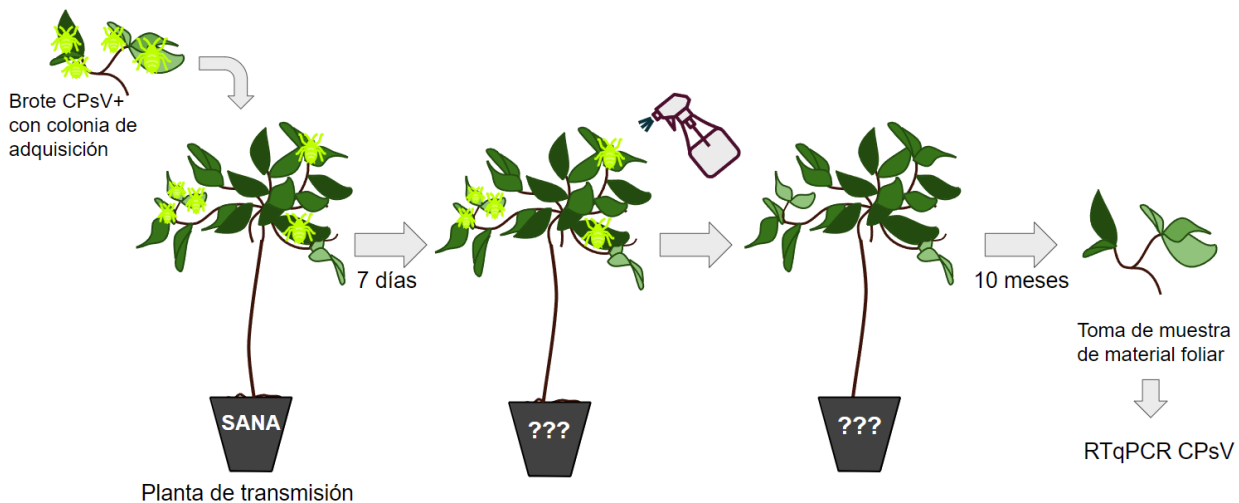


Figura 20: Esquema del ensayo de transmisión de CPsV por *T. citricida* en NDP, LR y NV sobre *P. trifoliata*.

Las plantas fueron mantenidas en invernadero bajo condiciones de temperatura de 20-35°C. Al cabo de 10 meses no se detectó CPsV por RTqPCR en material foliar de ninguna de las plantas del ensayo.

#### 4.5.4.2 Ensayo 2 de transmisión de CPsV por *A. gossypii*

Este ensayo se realizó a partir del material del Ensayo de adquisición 4 por *A. gossypii*. Se tomaron las 4 plantas NV sobre *P. trifoliata* (plantas de adquisición) con las colonias de *A. gossypii* alimentándose de ellas y se las colocó en una jaula cubierta con malla anti áfidos junto con plantas sanas certificadas libres de enfermedades: 2 LR, 2 NDP y 3 NV sobre *P. trifoliata* (denominadas plantas de transmisión, 7 plantas en total). Además, se utilizaron 4 plantas de adquisición adicionales, no utilizadas en el Ensayo 4: 2 LR y 2 NDP infectados por injerto con CPsV 90-1-1. Todas las plantas fueron mantenidas en invernáculo con régimen de luz natural y temperatura controlada entre 20-35 °C.

A diferencia de los ensayos anteriores, en este caso se colocaron 2 plantas de transmisión dentro de la jaula junto con 3 plantas de adquisición infectadas con CPsV 90-1-1. Cada 7 días se retiraron dos plantas, una infectada y una de transmisión, que se asperjaron con MAMBORETÁ-D y posteriormente se podaron. Al mismo tiempo se reemplazaron estas plantas con otras dos plantas (nuevamente una de adquisición y una de transmisión) que presentaran brotes jóvenes, para estimular el movimiento de los áfidos a éstas. Es importante señalar que los efectos sistémicos de MAMBORETÁ-D persisten en la planta por 2 semanas, por lo que al reintroducir a la jaula plantas previamente asperjadas se tuvo la precaución de dejar pasar al menos 20 días luego del tratamiento con el insecticida.

Se observó la presencia de insectos en ambos tipos de planta (de adquisición y de transmisión) a lo largo de todo el ensayo. En estas jaulas el recambio de plantas se mantuvo semanalmente durante 10 meses para permitir que los áfidos se muevan múltiples veces entre las plantas infectadas y las de transmisión. En total, cada planta de transmisión fue podada y colonizada por áfidos 6 veces a lo largo de la duración del ensayo. El procedimiento está esquematizado en la Figura 21.

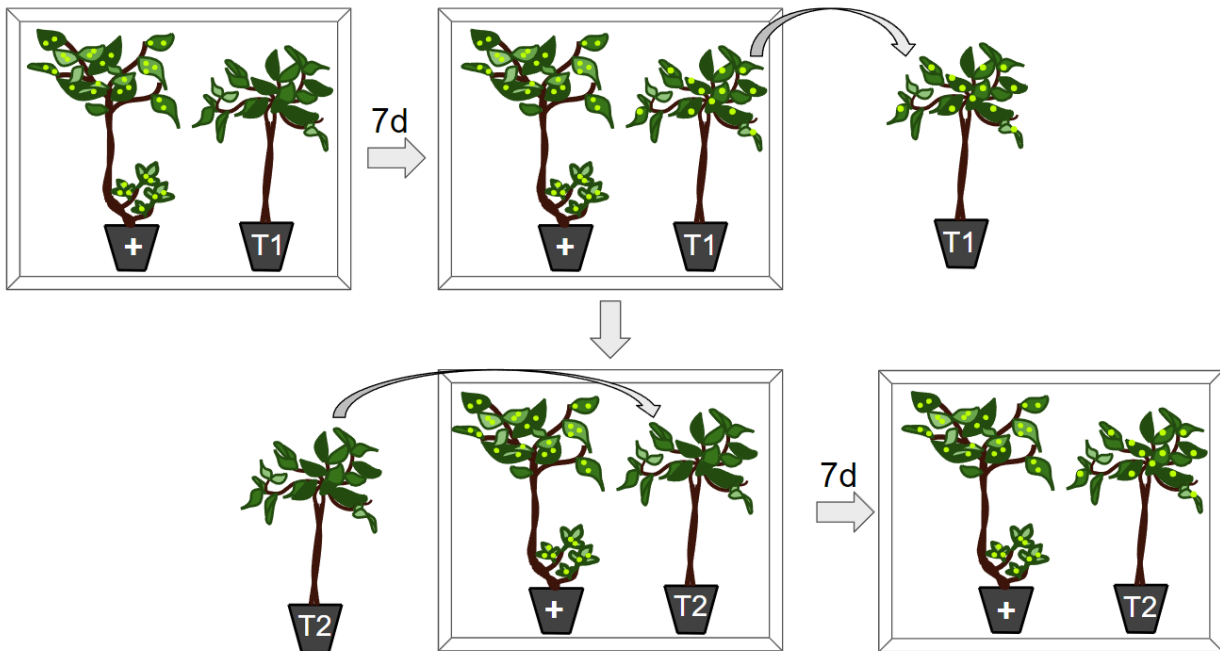


Figura 21: Esquema del ensayo 2 de transmisión de CPsV por *A. gossypii* en LR, NDP y NV sobre *P. trifoliata*. +: plantas infectadas con CPsV, T: plantas de transmisión.

Las 7 plantas de transmisión fueron analizadas al finalizar el ensayo y nuevamente 6 meses más tarde. No se detectó CPsV en ninguna de ellas.



## 4.6 Discusión

Para CTV, cuyo vector de transmisión natural es *T. citricida*, se han reportado tasas de adquisición de casi el 100% (Herron *et al.*, 2006) y de transmisión entre 9 y 80%, según las condiciones del ensayo (Hermoso de Mendoza, 1984). Si bien los cítricos utilizados (LR y NDP) son sensibles a CTV, no son las variedades en las que el virus tiene su mayor tasa de multiplicación, por lo que la carga viral en estas plantas podría ser más baja que al infectar, por ejemplo, *Citrus x aurantiifolia* (Lima). Es decir, si bien las tasas de adquisición del Ensayo Control alcanzaron valores de 33 a 77% en cítricos como NDP y LR, los resultados en lima probablemente hubieran alcanzado valores más altos. Esto confirma que las condiciones del ensayo eran las adecuadas para permitir la adquisición de virus y los resultados obtenidos para los ensayos de adquisición con CPsV son confiables.

*T. citricida* fue capaz de adquirir CPsV, pero lo hizo con una tasa muy baja detectándose el virus en el RNA total proveniente de un único *pool* de 10 ninfas que se estaban alimentando de un LR. Si se considera que sólo una ninfa de 10 en el *pool* fue la que adquirió CPsV, la tasa de adquisición resultante sería de 0,35%. Por otro lado, si se considera que los 10 individuos adquirieron CPsV, la tasa de adquisición sería del 3,5%, lo que implica que en los 270 áfidos restantes de ese grupo (ninfas alimentándose de un LR en el Ensayo 3) entre 1 y 9 individuos más deberían haber adquirido CPsV ( $270 \times 3,5/100 = 9,45$ ) lo que habría resultado en un mayor número de *pools* positivos para CPsV, resultado que no se obtuvo.

Se podría considerar la posibilidad de que los 10 individuos del *pool* se encontraban comiendo de una misma hoja con elevada concentración de partículas virales de CPsV. Sin embargo los distintos individuos que contiene cada *pool* fueron recolectados de distintas partes de la hoja e incluso de distintos brotes. Por lo tanto, es probable que menos de 10 ninfas hayan adquirido el virus y la tasa sea menor a 3,5%.

Cabe destacar que esta adquisición de CPsV por *T. citricida* ocurrió al alimentarse de un LR, que es una especie cítrica en la que el virus se multiplica a niveles mayores que los detectados en otros cítricos como naranjos y mandarinas (García *et al.*, 1991). Esto sugiere que la adquisición podría ocurrir cuando el insecto se alimente de un floema con una elevada concentración de partículas virales.

Una tasa de adquisición tan baja implica que para generar infección en la planta sería necesario un número elevado de áfidos para lograr la transmisión. También hay que considerar la posibilidad de que la planta se defiende frente a un bajo nivel de

multiplicación viral, lo que podría llevar a que la enfermedad se manifieste mucho más tarde y sea la causa del largo período de latencia hasta que se manifiestan los síntomas a campo.

Por otro lado, las moléculas de CPsV detectadas podrían haber estado dentro del contenido del sistema digestivo del insecto sin que hubiera habido una interacción molecular entre viriones y áfido y por lo tanto no estar asociado a una transmisión.

Como se mencionó en la sección de antecedentes, en el trabajo de Hernández-Rodríguez *et al.* (2020) se mantuvieron durante 30 días jaulas cubiertas de malla anti áfidos conteniendo una planta infectada con CPsV y 12 plantines MV libres de enfermedades. En estos ensayos se desconoce cuántos insectos se alimentaron de la planta infectada y luego migraron a los plantines sanos. Como ya se mencionó, los áfidos tienden a ubicarse en un punto de la hoja y alimentarse allí toda su vida sin moverse. Los 30 días de duración de este ensayo fueron determinados por la aparición de colonias en todos los plantines MV. Es posible que un único áfido haya migrado de la planta enferma a la sana y ese individuo haya dado origen a una colonia observada en el plantín. Considerando la tasa de adquisición encontrada en este trabajo de tesis (0,35%) la probabilidad de que un único áfido virulífero sea suficiente para transmitir es muy baja, lo que coincide con los resultados reportados por Hernández-Rodríguez *et al.*, que concluyen que *T. citricida* es incapaz de transmitir CPsV bajo las condiciones evaluadas. En el otro ensayo realizado por este grupo de trabajo, denominado colonización inducida, se tomaron 5 áfidos adultos ápteros que se encontraban alimentándose de plantas infectadas con CPsV y se los transfirió a brotes jóvenes de plantines de MV sanos. Se limitó el movimiento de estos insectos cubriendo cada brote con una bolsa plástica transparente. Se utilizaron 4 plantas fuente de CPsV y 3 plantines MV por cada planta fuente, dando un total de 60 áfidos. Nuevamente, si sólo 0,35% de los áfidos (ninfas) son capaces de adquirir CPsV es posible que ninguno de los 60 individuos adultos de este ensayo haya adquirido el virus.

Finalmente, en el trabajo de Hernández-Rodríguez *et al.* (2020) también evalúan la adquisición de CPsV por parte de los áfidos analizando por RT-PCR 4 *pool*es de 80 a 100 áfidos y sin detectar CPsV en ninguno de ellos. En este trabajo de tesis se aplica la técnica de RT-qPCR desarrollada por De Francesco *et al.* (2015) cuyo límite de detección es mayor al de las técnicas de RT-PCR y TAS-ELISA, siendo capaz de detectar 1000 moléculas de un fragmento de DNA de la proteína de cubierta en 1 uL de cDNA molde. A mayor número de áfidos no virulíferos en un *pool*, menor es la probabilidad de detectar el virus contenido en un único individuo. Por lo tanto, en un *pool* de 80-100 áfidos la probabilidad de detección del virus es menor que en *pool*es de

10 individuos. Por lo tanto, es esperable que Hernández-Rodríguez *et al.* (2020) no hayan detectado CPsV en ninguno de los *pooles* evaluados.

Por otro lado es importante mencionar los trabajos de Maeso *et al.*, (2000) y Costa *et al.* (2013). Ambos observan evidencia de transmisión de la enfermedad psorosis al colocar plantines de cítricos aislados del suelo alrededor de plantas infectadas con CPsV. Además, en el trabajo de Maeso *et al.* (2000), contaron con controles aislados por mallas anti áfidos. En estos experimentos se permitió el movimiento libre de todo tipo de insectos entre las plantas, pero ambos grupos de investigadores proponen a *T. citricida* como posible vector debido a que fue la especie observada con mayor frecuencia en ellas, sin descartar otros insectos como posibles vectores. En estos ensayos realizados a campo las plantas se encuentran expuestas a miles de áfidos y es posible que aún con una tasa de adquisición tan baja como 0,35% (y una tasa de transmisión aún menor) hubiera ocurrido la transmisión de CPsV por este vector. También es posible que esta transmisión hubiera sido mediada por alguna de las múltiples especies de áfidos y otros insectos que se alimentan de cítricos a campo y que no fueron evaluados en este trabajo de tesis como *A. citricola*, *T. aurantii* y *D. citri*, entre otros.

Por lo tanto, los resultados de este trabajo de tesis no contradicen las conclusiones de Hernández-Rodríguez *et al.* (2020). Maeso *et al.* (2000) y Costa *et al.* (2013) concluyen que la transmisión de la enfermedad ocurre mediante un vector alado, probablemente *T. citricida*. Los resultados de este trabajo de tesis no son suficientes como para rechazar esta conclusión, pero permiten afirmar que es muy poco probable que *T. citricida* sea el vector de transmisión natural de la enfermedad ya que la tasa de adquisición es muy baja y, por ende, es muy poco probable que este insecto pueda transmitir el virus.

Por otro lado, si se considera que CPsV puede permanecer latente en la planta durante años, los resultados negativos obtenidos en los ensayos de transmisión podrían tratarse de falsos negativos, ya que pasado cierto tiempo (meses o años) CPsV podría multiplicarse hasta llegar a un nivel en el que sería detectado. Al menos se puede decir que con la especie *T. citricida*, el número de individuos y bajo las condiciones ensayadas el inóculo de CPsV no es suficiente para multiplicarse y detectarse por RT-qPCR al cabo de 10 meses de que la colonia de áfidos haya comenzado a alimentarse.

Por último, estos ensayos no permitieron afirmar que la adquisición por *T. citricida* depende del tiempo de alimentación del insecto, ya que no se observó adquisición en los ensayos con tiempos de alimentación de 24h, 48h ni 22 días, pero sí en el ensayo

con tiempo de adquisición de 10 días. En este último ensayo (Ensayo 3 de adquisición por *T. citricida*) las temperaturas máximas alcanzadas (35°C) fueron mayores que en el resto de los ensayos realizados con esta especie de áfido (24°C) lo que podría indicar que este proceso es más eficiente a temperaturas mayores a 24 °C. Se sabe que en la región del NEA las temperaturas máximas en los meses de enero y diciembre superan los 30°C (<https://www.entreriosturismo.com.ar/clima-temperaturas.html>), por lo que este factor podría ser relevante.

Para el caso de *A. gossypii* no se detectó adquisición de CPsV al alimentarse de NV ni *P. trifoliata*. En el ensayo de transmisión de CPsV por parte de *A. gossypii* los insectos se movieron incontables veces entre plantas de transmisión y enfermas, lo que brinda mayor confianza en la posibilidad de transmitir el virus. Aún así no se observó transmisión durante los 10 meses del transcurso del ensayo ni después de 6 meses de su finalización.

Por lo tanto, bajo las condiciones ensayadas ni *A. gossypii* ni *T. citricida* son capaces de transmitir CPsV.

Por último, como se mencionó en el Capítulo 1, *Olpidium* spp. es otro posible vector para CPsV debido a que es el vector natural de otros virus pertenecientes a la familia *Aspiviridae*.

## 4.7 Conclusiones

- Bajo las condiciones aplicadas en este trabajo de tesis (fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) *T. citricida* es capaz de adquirir CTV con una tasa que va del 41 al 65% al alimentarse NDP infectado.
- El ensayo control de CTV permitió afirmar que las condiciones utilizadas en estos ensayos eran las adecuadas para abordar los ensayos con CPsV.
- *T. citricida* no es capaz de adquirir CPsV al alimentarse de NDP o LR infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de períodos de adquisición de 24h, 48h y 22 días con fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- *T. citricida* es capaz de adquirir CPsV con una tasa del 0,35% al alimentarse de limón rugoso infectado con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de un período de adquisición de 10 días con régimen de luz natural a temperaturas entre 20 y  $35^{\circ}\text{C}$ .
- *A. gossypii* no es capaz de adquirir CPsV al alimentarse de naranjo Valencia o *P. trifoliata* infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de un período de adquisición de 10 días en invernáculo.
- *T. citricida* no es capaz de transmitir CPsV al alimentarse de NDP o LR infectados con CPsV 90-1-1, con un período de adquisición de 10 días con régimen de luz natural y temperaturas de  $20-35^{\circ}\text{C}$ , y con un período de transmisión de 7 días.
- *A. gossypii* no es capaz de transmitir CPsV al alimentarse de NDP, LR, naranja Valencia o *P. trifoliata* infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de 6 semanas de permitir que los insectos se muevan entre éstas plantas y naranjos Valencia sobre *P. trifoliata* libres de enfermedades.

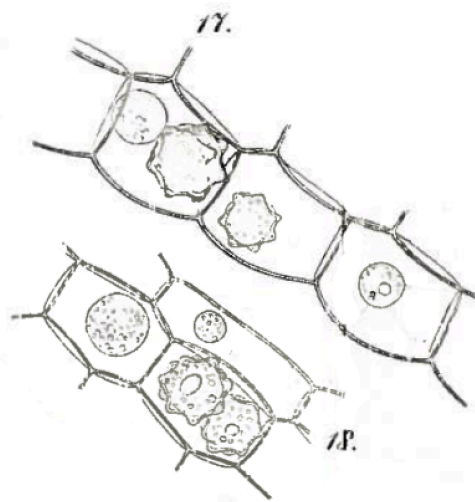
## 4.8 Perspectivas

Habiendo obtenido una tasa de adquisición tan baja en los ensayos de adquisición de CPsV por *T. citricida* será necesario repetir estos experimentos utilizando un número de áfidos mucho mayor al de los ensayos de esta tesis, aumentándolo al menos en un orden de magnitud ya que el valor de la tasa de adquisición obtenida es de 0,35%, lo que significa que encontrar un resultado positivo en un menor número de individuos depende del azar. También es importante destacar que el único evento de adquisición detectado ocurrió al mantener las plantas en un rango de temperatura de 20-35°C, lo que sugiere que estos ensayos deberían repetirse bajo condiciones de temperatura más elevadas.

Los antecedentes indican que la tasa de transmisión de CTV por *T. citricida* puede variar entre un 11 y un 89% según distintas condiciones como tiempos de adquisición, número de áfidos y especie de cítrico utilizada (Roistacher, 1987). Si se considera una variabilidad similar para CPsV, resultados concluyentes requerirán de muchos más ensayos similares a los realizados en este trabajo, modificando las variables mencionadas.

Por otro lado, para poder determinar el vector natural en caso de que se trate de un insecto alado, sería necesario realizar ensayos con otras especies de áfidos y otros insectos que se alimenten de cítricos y que se encuentren en la región citrícola del NEA como *Aphis citricola*, *Toxoptera aurantii* y *Diaphorina citri*.

# CAPÍTULO 5: TRANSMISIÓN DE CPsV POR *Olpidium* spp.



# 5 Introducción

En esta sección se describe la biología de *Olpidium* spp., la taxonomía de las especies pertenecientes a este género y los mecanismos moleculares de transmisión de virus. Posteriormente se describen los ensayos que permitieron determinar que *O. virulentus* es el vector de transmisión natural de varias de las especies virales de la familia *Aspiviridae*.

## 5.1 Biología de *Olpidium* spp.

Desde la primera descripción de *Olpidium brassicae* realizada en 1878 por Woronin, los diversos grupos de investigación llamaron a este hongo y otras especies relacionadas de diversas maneras (Lay *et al.*, 2018). Las diversas fuentes bibliográficas citadas en esta sección hablan específicamente sobre la biología de *O. brassicae*, pero es necesario señalar que los procesos y mecanismos descritos también ocurren en otras especies del género como *O. virulentus* y *O. bornovanus*. Las principales diferencias entre éstas últimas y *O. brassicae* se relacionan con la capacidad de estas especies de transmitir virus y su especificidad por el hospedante, aunque también presentan algunas diferencias morfológicas (Lay *et al.*, 2018).

*O. brassicae* es un parásito obligado que coloniza células de las raíces de plantas (Figura 1). Dentro de la célula hospedadora conforma una estructura denominada talo delimitada por una pared (Figura 2A y 2B) en la que el protoplasma se concentra en uno o más centros a partir de los cuales se pueden ramificar estructuras tubulares similares a raíces, denominadas tubos de descarga. El talo puede diferenciarse en zoosporas (Figura 2F) o bien esporas de resistencia o reposo (Figura 1 y Figura 2D). Las zoosporas contienen un único flagelo que les da movilidad en medio líquido, mientras que las esporas de resistencia presentan una pared doble.



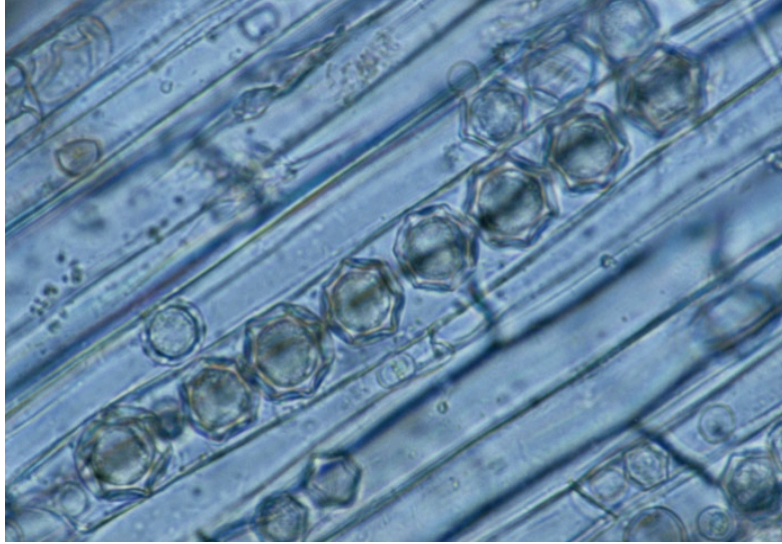


Figura 1: Esporas de resistencia de forma icosaédrica de *O. virulentus* en raíces de *Lactuca sativa* (lechuga), tomado de <http://ephytia.inra.fr/> (2023)

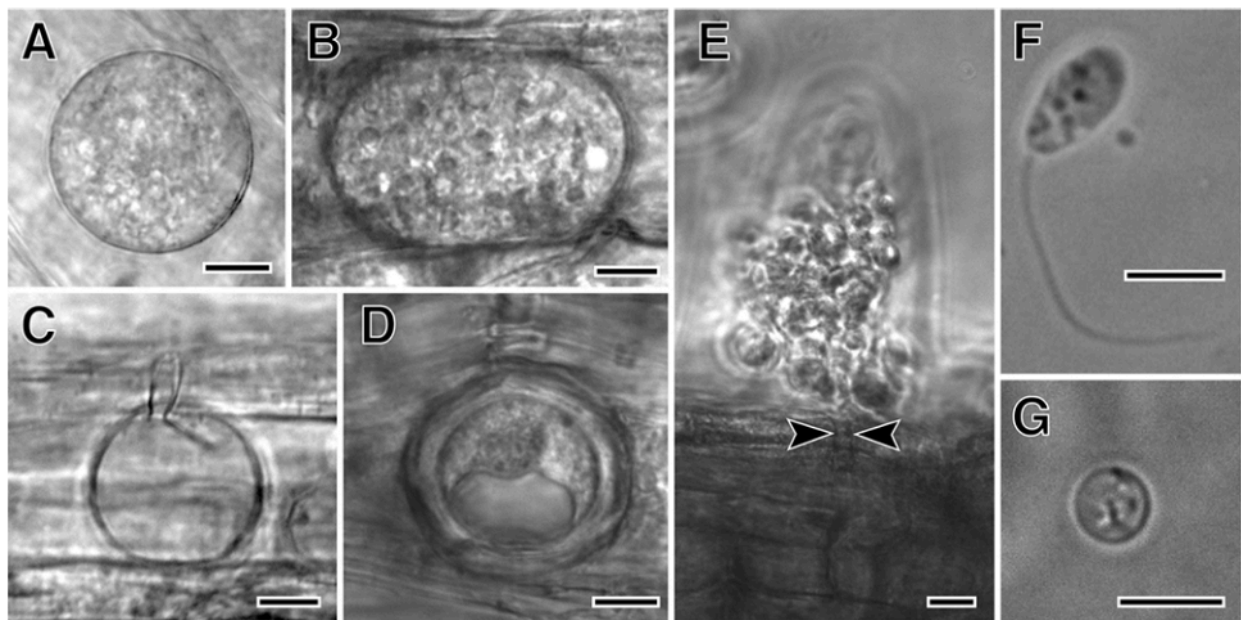


Figura 2: A y B) Talos vegetativos unicelulares de *O. bornovanus* en raíces de *Cucumis sativus* (pepino). C) Un talo vacío luego de la liberación de sus zoosporas. D) Espora de resistencia con doble pared. E) Zoosporas siendo liberadas de un esporangio, las flechas señalan el tubo de salida. F) Una zoospora en nado, con un único flagelo posterior. G) Una zoospora enquistada. Escala: Líneas A-E 10  $\mu$ m; F,G = 5  $\mu$ m. (Tomado de Sekimoto *et. al.*, 2011).

Cuando una célula colonizada por *Olpidium* spp. entra en contacto con agua las zoosporas maduras son liberadas al medio (Figura 2E). Las esporas de reposo resisten

todo tipo de estrés ambiental y pueden permanecer latentes durante décadas (Webster y Weber, 2007).

### 5.1.1 Colonización de raíz

*O. brassicae* se encuentra comúnmente en raíces de *Brassica oleracea* var. *capitata* (repollo blanco), particularmente en suelos húmedos pero es capaz de invadir las raíces de un amplio rango de hospedantes no relacionados (Lay *et al.*, 2018).

Las células de la epidermis de las raíces de repollos colonizados por *O. brassicae* contienen uno o más talos cilíndricos o esféricos, que en ocasiones se observan ocupando toda la célula. El citoplasma del talo es de aspecto granular (Figura 3A) y su contenido se divide posteriormente en numerosas zoosporas sin flagelo que se escapan a través de uno o más tubos de descarga (Figura 3A y 3B) que penetran la pared externa de la célula hospedante (Temminck y Campbell, 1968).

La liberación de zoosporas ocurre dentro de los primeros minutos de contacto de la raíz con el agua. La punta del tubo de descarga se deshace y las zoosporas escapan, nadando activamente en el agua con su único flagelo (Figura 3D) durante unos 20 minutos. Si se colocan raíces de plántulas de repollo en una suspensión de zoosporas éstas colonizan los pelos de la raíz y células epiteliales adhiriéndose a la superficie para luego retirar su flagelo y sufrir modificaciones en su pared, formando estructuras llamadas quistes. Tanto la pared de los quistes como la de la célula vegetal se disuelven en el punto de unión y la célula es penetrada (Temminck y Campbell, 1969a y b) permitiendo que el contenido del quiste sea transferido al interior de la célula. Este proceso puede ocurrir en menos de una hora (Aist e Israel, 1977). Al cabo de 2 días post infección se pueden observar talos esféricos en las células de la epidermis de la raíz. A los 45 días se observa desarrollo de tubos de descarga y los talos se encuentran en condiciones de liberar las zoosporas.

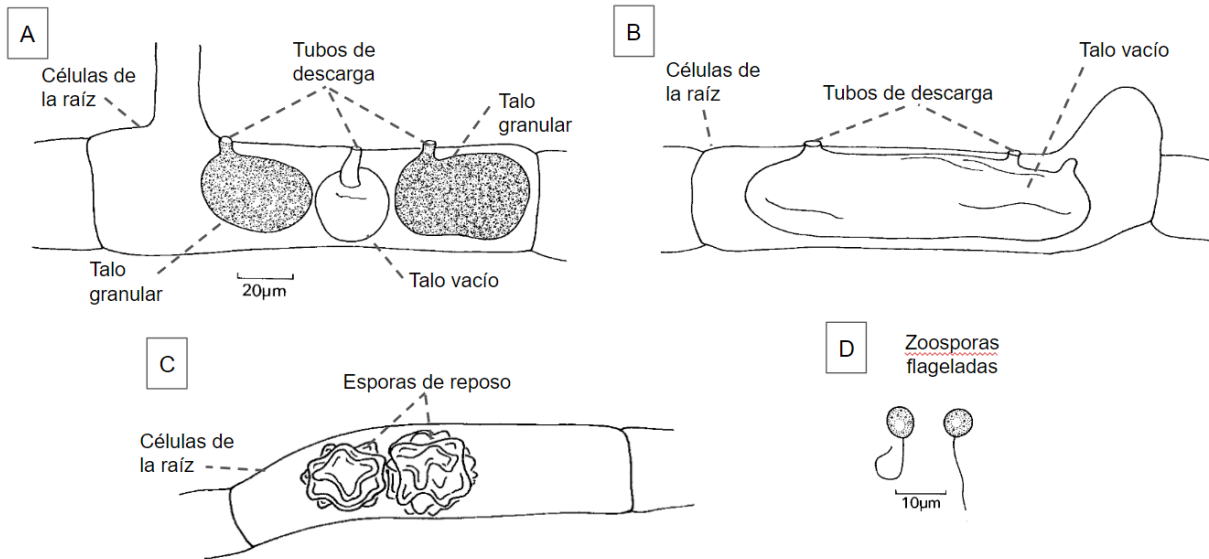


Figura 3: *O. brassicae* en raíces de *Brassica oleracea*. Los dibujos están realizados a la escala indicada (Modificado de Webster y Weber, 2007).

En algunas células de la raíz se pueden observar cuerpos estrellados con paredes gruesas y sin tubos de descarga. Se trata de esporas de reposo (Figura 3C y Figura 4).

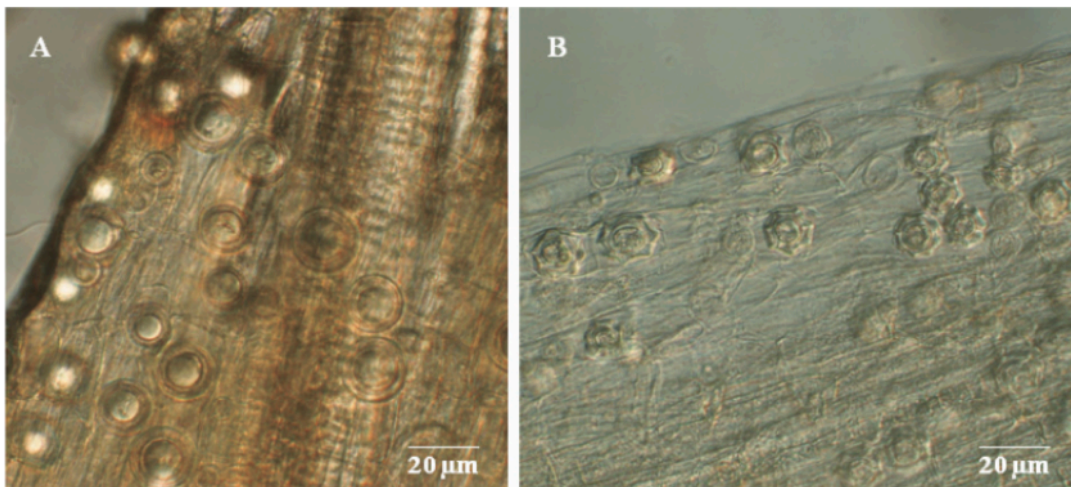


Figura 4: Esporas de resistencia de A) *O. bornovanus* y B) *O. brassicae*. Tomado de Bol. san. veg. Plagas (2012).

Estas esporas son altamente resistentes al estrés ambiental y son capaces de sobrevivir durante décadas, manteniéndose virulíferas en los casos en los que hayan

adquirido virus (Campbell, 1985; Hiruki, 1987). La morfología de estas esporas es una de las diferencias entre *O. bornovanus* (esporas esféricas de pared de aspecto liso, Figura 4A) y *O. brassicae* y *O. virulentus* (ambos con esporas de forma estrellada/icosaédrica, Figura 4B; Lay *et al.*, 2018).

### 5.1.2 Patogenicidad de *Olpidium* spp.

Woronin (1878) negaba que *O. brassicae* fuera el agente causal de la hernia de la col, pero sospechaba que podría causar otras enfermedades del repollo. Más adelante otros investigadores sugirieron que *O. brassicae* podría ser el agente causal de diversas enfermedades que afectaban cultivares de lino, tabaco, coliflor, frutilla y nabo (Marchal, 1901; Peters y Schwarz, 1912; van der Meer, 1926; Hildebrand, 1934; Koch, 1935; Jacobsen, 1943).

Sin embargo, diversos reportes indicaban que la sanidad de los cultivares de tabaco, tomate y repollo no se veía afectada por *O. brassicae* (Bensaude, 1923, Vanterpool 1930). Por otro lado, Jacobsen observó disminución del crecimiento en nabos y coliflores infectados con *O. brassicae* pero concluyó que este efecto probablemente era causado por *Pythium* y *Rhizoctonia* (Jacobsen, 1943).

Durante la década de 1950 investigaciones sobre la enfermedad big-vein de la lechuga llevó a dos grupos de investigadores a concluir de manera independiente que esta enfermedad y *O. brassicae* se encuentran estrechamente relacionados (Fry, 1958; Grogan *et al.*, 1958). Ese mismo año Haeske reportó partículas cilíndricas de aspecto viral en las raíces de plantas infectadas con big-vein (Haeske, 1950). Más adelante, Tomlinson y Garrett demostraron que *O. brassicae* era capaz de adquirir el agente causal de la enfermedad y subsecuentemente transmitirlo a raíces de lechuga sana (Tomlinson y Garrett, 1964). En este trabajo también se demostró que *O. brassicae* puede adquirir el agente causal de big-vein y perderlo al colonizar raíces de llantén mayor (*Plantago major*) o plantas del género *Veronica* (familia *Plantaginaceae*).

En 1962 Teakle descubrió que *O. brassicae* puede actuar como vector para el virus de la necrosis del tabaco (TNV, familia *Tombusviridae*; Teakle, 1962) y poco tiempo después Hiruki reportó la transmisión del tobacco stunt virus (TStV, género *Varicosavirus*) por *O. brassicae* (Hiruki, 1964; 1965)

Debido a la capacidad de *O. brassicae* de transmitir tres virus que infectan plantas, los antecedentes lo describen como vector viral. Dentro de las observaciones realizadas

por Tomlinson y Garrett (1964) se encontraban variantes de *O. brassicae* aisladas a partir de raíces de repollo que no eran capaces de colonizar raíces de lechuga, lo que fue confirmado por diversos experimentos realizados con variantes de *O. brassicae* provenientes de distintas fuentes (Kassanis y MacFarlane, 1965; Teakle y Hiruki, 1964; Temmink *et al.*, 1970). En la siguiente sección se describe cómo gracias a las técnicas de secuenciación masiva se determinó que estas variantes de *O. brassicae* en realidad se trataban de distintas especies de *Olpidium* spp.

## 5.2 Taxonomía

Los antecedentes bibliográficos reportan que *O. brassicae* y algunos otros miembros de la familia como *Olpidium bornovanus* son vectores de virus de plantas (Campbell, 1996). Sin embargo, la delimitación entre especies del género *Olpidium* ha cambiado a lo largo del estudio de este hongo (Sampson, 1939; Sahtiyanci, 1962; Campbell y Sim, 1994; Barr, 2001) lo que causó confusión dentro de la literatura científica.

### 5.2.1 Múltiples nombres para *O. brassicae*

La primer descripción de *O. brassicae* fue realizada en 1878 por Woronin (1878), quien lo descubrió accidentalmente en células de la epidermis de raíces de *Brassica oleracea* var. *capitata* (repollo) al intentar descubrir la causa de la hernia de la col. Woronin llamó a su descubrimiento *Chytridium brassicae* y describió sus características principales: tubos de descarga, zoosporas esféricas y esporas de reposo de aspecto estrellado. Más adelante en 1886 Dangeard observó que estas características junto con el ciclo de vida parasítico de *C. brassicae* se correspondía con propiedades de especies pertenecientes al género *Olpidium* y de esta manera lo reclasificó dentro de dicho género manteniendo el nombre *brassicae* (Dangeard, 1886).

En 1893 de Wildeman (1893) propuso el nombre *O. borzii* para un hongo hallado en las raíces de repollo y *Capsella bursa-pastoris* (otro miembro de *Brassicaceae*) y denominó *Asterocystis radialis* a otro hongo observado en diversas plantas hospedadoras pertenecientes a *Brassicaceae* y a *Poaceae* (gramíneas) (de Wildeman, 1893). Posteriormente de Wildeman modificó el nombre de *O. borzii* a *O. radicolum* para reflejar que la forma de los tubos de descarga se asemejaban a insectos de la familia

*Curculionoidea* (“radicole” en francés) y porque el nombre *O. borzii* era muy similar a *O. borzianum* (Jacobsen, 1943; Saccardo *et al.*, 1888).

Un nombre que se popularizó en la bibliografía para *Olpidium spp.* fue *A. radialis*, debido al aspecto estrellado de las esporas de reposo que son fácilmente reconocibles. Bajo este nombre el hongo fue observado y descrito en la Argentina (Girola, 1920), Canadá (Koch, 1935; Vanterpool, 1930) y Europa occidental (Guyot, 1927; Marchal, 1901). Sin embargo, debido a que el nombre *Asterocystis* era utilizado en especies de algas, Pascher propuso cambiar el género a *Olpidiaster* para reflejar la morfología del hongo y evitar confusión (Pascher, 1917). Pero esta nomenclatura fue rechazada por Karling (1937) porque el nombre del género de algas se escribe “*Asterocytis*” en lugar de “*Asterocystis*”. Sin embargo, otro género de hongos llamado *Astrocystis* había sido establecido en 1873 (Arwidsson, 1938) por lo que, independiente de la ortografía, resultó necesario cambiar el nombre *Asterocystis*.

En 1939 Sampson propuso cinco nombres de especies como sinónimos para *O. brassicae*: *C. brassicae*, *O. borzii*, *Asterocystis radialis*, *O. radicum*, y *Olpidiaster radialis* (Sampson, 1939) basándose en comparaciones morfológicas de zoosporas y esporas de reposo de diversas muestras de raíces de *O. brassicae* provenientes de raíces de argostis (familia *Poaceae*), coliflor (*Brassica oleracea*), repollo (*Brassica oleracea* var. *capitata*) y nabo (*Brassica × napobrassica*). Este concepto fue aceptado y confirmó el entendimiento general de la fisiología, morfología, patogenicidad y especificidad por el hospedante de *O. brassicae*. Dos nombres propuestos por Barr en su monografía publicada en 1980, *P. brassicae* y *P. virulentus*, se volvieron sinónimos de *O. brassicae*.

Con el avance de las técnicas de secuenciación se logró realizar un análisis molecular que permitió distinguir las especies del género *Olpidium*.

## 5.2.2 *Olpidium spp.* en la era molecular

Jiang y Hiruki (1996) realizaron análisis por PCR-RFLP de *Olpidium spp.*, lo que les permitió diferenciar *O. bornovanus* de *O. brassicae* pero no dejaron registros disponibles de las secuencias obtenidas. En 1998 otro grupo de investigación incluyó en su estudio de *Polymyxa spp.* información de una secuencia de DNA ribosomal de *O. brassicae* (Ward y Adams, 1998), información que luego fue utilizada para construir un árbol filogenético que sugería que el aislamiento utilizado por Ward y Adams se trataba de *O. virulentus* (Hartwright *et al.*, 2010).

Sasaya y Koganezawa (2006) se enfocaron en aislamientos de *Olpidium spp.* aislados de diversos hospedantes demostrando la existencia de claras diferencias filogenéticas entre *O. brassicae*, *O. virulentus* y *O. bornovanus* basándose en las diferentes longitudes de secuencia de un espaciador transcrito interno (ITS, Internal transcribed Spacer; Sasaya y Koganezawa, 2006). Estas diferencias junto con otras que incluían sexualidad, morfología y especificidad por el hospedante les permitieron concluir que se trataba de especies distintas.

Basándose en este trabajo, un grupo español (Herrera-Vasquez *et al.*, 2009) desarrolló una PCR multiplex capaz de detectar e identificar *O. bornovanus*, *O. brassicae* y *O. virulentus* a partir de mezclas artificiales, lo que les permitió a su vez demostrar que *O. virulentus* y *O. bornovanus* pueden coinfectar simultáneamente la misma planta, mientras que *O. brassicae* no posee esta capacidad. Además, esta última especie sólo se observó en raíces de repollo y brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Los cebadores desarrollados por Herrera-Vasquez *et al.* fueron utilizados en este trabajo de tesis.

Debido a todas estas recategorizaciones y cambios en los nombres de las especies en la bibliografía citada se pueden encontrar los diversos nombres con los que se ha referido a *Olpidium spp.*

La secuenciación masiva permitió verificar las elevadas proporciones en las que *O. brassicae* y otras especies pertenecientes a *Olpidium spp.* conforman comunidades fúngicas dentro de raíces o rizosferas (Lay *et al.*, 2016; Tkacz *et al.*, 2015). Actualmente podemos afirmar que *O. brassicae* infecta principalmente a plantas pertenecientes a la familia *Brassicaceae* y no actúa como vector viral. Por otro lado, *O. virulentus* es capaz de invadir las raíces de múltiples especies vegetales excluyendo a los miembros de *Brassicaceae* y actúa como vector de virus vegetales (Lay *et al.*, 2018).

## 5.3 Transmisión de virus por *Olpidium spp.*

Existen muchos virus capaces de ser transmitidos por *Olpidium spp.* El proceso de adquisición puede ser *in vivo*, ingresando la partícula viral al interior de la espora, o bien *in vitro*, al adherirse el virión a la superficie de la pared del hongo (Webster y Weber, 2007).

Por ejemplo, tobacco necrosis virus A (TNV, virus RNA positivo perteneciente al género *Alphanecrovirus*, familia *Tombusviridae*) y cucumber necrosis virus (CNV, virus RNA positivo del género *Tombusvirus*, familia *Tombusviridae*) son adquiridos *in vitro* por esporas de *O. brassicae* y *O. bornovanus*, respectivamente. Las partículas virales son adsorbidas por la membrana de la zoospora e ingresan a la cubierta flagelar, que es continua con la membrana (Temmink *et al.*, 1970). La unión ocurre entre la cubierta viral y moléculas específicas de la superficie de la zoospora (Kakani *et al.*, 2003; Rochon *et al.*, 2004). En el enquistamiento, cuando el flagelo es incorporado dentro de la zoospora, las partículas virales son introducidas al citoplasma de la zoospora y luego transmitidas a la planta.

Para el caso de TNV se demostró que la adquisición es *in vitro* en 1966. Se tomaron tanto raíces secas como frescas conteniendo tanto *Olpidium* como TNV. Se trató este material con HCL 5N y se observó que luego de este baño ácido ninguna de las muestras resultó capaz de transmitir el virus a pesar de que las esporas sobrevivieron. Esto indica que TNV no se encuentra dentro de la espora, ya que la doble pared debería haberlo protegido. TNV se adhiere a la superficie de la espora de resistencia y esta unión (o bien la partícula viral en sí) es degradada al tratarse el material con ácido fuerte concentrado (Campbell y Fry, 1966).

En contraste, lettuce big vein virus (LBVV) es adquirido *in vivo* y se encuentra en el interior de las zoosporas que emergen de las esporas de reposo (Campbell, 1996). El virus es capaz de persistir dentro de esporas de reposo durante 18-20 años (Grogan *et al.*, 1958, Campbell, 1985).

### 5.3.1 Antecedentes de transmisión de *ophiovirus* por *Olpidium* spp.

A lo largo del siglo XXI distintos grupos de trabajo han determinado que *Olpidium virulentus* es capaz de transmitir 5 de los 6 miembros de esta familia (Dorst, 1975; Campbell y Lot, 1996; Lot *et al.*, 2002; Morikawa *et al.*, 1997; Shands *et al.*, 2017).

En 1975 van Dorst determinó la transmisión por suelo de la enfermedad freesia leaf necrosis (Dorst, 1975), más de tres décadas antes de que freesia sneak virus (FreSV) fuera identificado como agente causal de esta enfermedad (Vaira *et al.*, 2006). El experimento de van Dorst consistió en tomar distintas muestras de suelo de plantas provenientes de 9 viveros y colocar en ellas plantas de freesias libres de



enfermedades. Este experimento demostró la transmisión por suelo de la enfermedad encontrando *O. brassicae* en las muestras de suelo.

En 1996 Campbell y Lot demostraron la capacidad de *O. brassicae* de transmitir tanto lettuce big vein virus (LBVV) como LBVV junto con el agente causal de lettuce ring necrosis (LRNA). A partir de plantas de *L. sativa* con síntomas de la enfermedad big-vein recolectadas de distintos lugares lograron demostrar la transmisión tanto de LRNA como de LBVV por suelo. También utilizaron raíces de estas plantas para establecer cultivos del hongo a partir de un único esporangio (Campbell, 1988). Brevemente, mediante recolección del agua proveniente de lavado de raíces y su posterior observación al microscopio se selecciona un único esporangio a partir del cual se establece una población en las raíces de una planta hospedadora compatible. Los investigadores lograron transmitir ambos agentes causales a plantines sanos de *L. sativa* a partir de un único esporangio, demostrando que *O. brassicae* es el vector de transmisión de estos virus. Más adelante el trabajo de Sasaya y Koganezawa (2006) demostró que la especie de *Olpidium* capaz de transmitir LBVV es *O. virulentus*.

En 2017 se realizaron ensayos en blueberry mosaic associated virus (BluMaV), encontrándose que *O. virulentus* puede transmitir este virus entre plantas de *Vaccinium corymbosum* L (arándano) (Shands *et al.*, 2017). En la Figura 5 se esquematiza el ensayo de transmisión; brevemente, se regaron grupos de plantines de arándano con el agua que eluye de las macetas al regar plantas de arándano denominadas “fuente”. Se ensayaron 3 grupos de plantas: el primer grupo consistió en plantas de arándano libres de enfermedades que presentaban *O. virulentus* en sus raíces. En el segundo se usaron plantas infectadas con BluMaV pero que no fueron colonizadas por *O. virulentus* en sus raíces. En el tercer grupo se usaron plantas infectadas con BluMaV con presencia de *O. virulentus* en sus raíces. Cuando se analizó la presencia de BluMaV en hojas de todos los plantines a los que se regó con el agua eluyente, sólo se detectó en aquellos que fueron regados con agua proveniente de las macetas del tercer grupo, demostrando que el vector de BluMaV era *O. virulentus*.

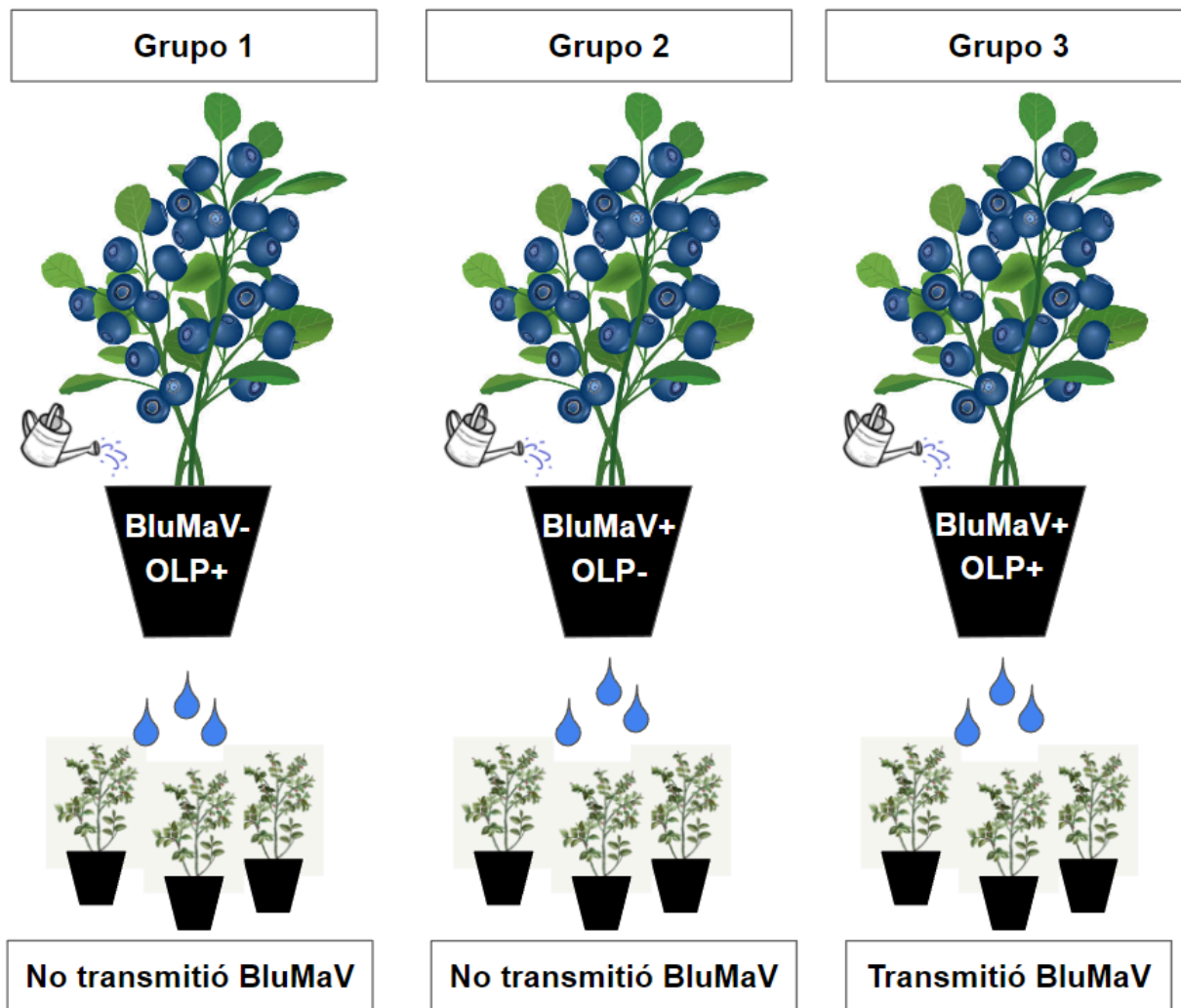


Figura 5: Esquema del ensayo de transmisión de BluMaV realizado por Shands *et al.* (2017).

Por último, se reporta transmisión por *O. brassicae* de tulip mild mottle mosaic virus (TMMMV). Los investigadores colocaron bulbos de tulipanes libres de enfermedades en campos con tulipanes que presentaban la enfermedad (infectados con TMMMV) y *Opidium* spp. y observaron su transmisión (Morikawa *et al.*, 1997).

Hasta el momento para CPsV sólo se reporta el trabajo de Palle *et al.* (2005) en Texas (EEUU). Los investigadores tomaron muestras de raíces de cítricos de campo con síntomas compatibles con psorosis y observaron la presencia de un gran número de estructuras similares a los talos característicos de *Opidium* spp. dentro de las células radiculares. La presencia de CPsV en estos árboles fue confirmada por ELISA y RT-PCR, detectando CPsV en las raíces de los árboles sintomáticos. Recolectaron esporangios a partir de la molienda en agua destilada de muestras secas de raíces

proveniente de estas plantas infectadas y concentraron las esporas mediante centrifugación a 9000 rpm. El grupo de trabajo fue capaz de detectar CPsV en estos concentrados mediante RT-PCR.

Luego evaluaron la transmisión de CPsV a plantines de *C. sinensis* (variedad Madame Vinous, MV) colocando éstos en tierra que contenía raíces de campo infectadas con CPsV. En paralelo colocaron plantines en medio líquido y los inocularon con zoosporas obtenidas de raíces infectadas con CPsV. Al cabo de tres meses no detectaron CPsV por RT-PCR ni ELISA en estos plantines. En este trabajo, los investigadores sólo pueden concluir que existe una asociación entre un hongo con características coincidentes con *Oplidium* spp. y CPsV. Si bien detectan CPsV en un extracto de raíces conteniendo esporas provenientes de cítricos infectados, los experimentos no determinan que se trate de *Oplidium* spp. ni que el virus se encuentre dentro de estas esporas. Tampoco demuestran transmisión por suelo ni por las esporas observadas.

Estos antecedentes reportan evidencia de transmisión mediada por *O. virulentus* de MLBVV, LRNV, FreSV, BluMaV, y TMMMV. Esto sólo deja a CPsV y ranunculus white mottle virus sin vector de transmisión conocido.

## 5.4 Objetivos

5.3.1 Determinar la presencia de *Olpidium* spp. en raíces de *Poncirus trifoliata*, *Citrus lemon* y los híbridos *Citrus sinensis* L. (naranja dulce Pineapple, NDP) y *Citrangue troyer*

5.3.2 Determinar si zoosporas de *Olpidium* spp extraídas de raíces de árboles infectados con CPsV son capaces de adquirir CPsV .

5.3.3 Determinación de la transmisión de CPsV a *P. trifoliata* mediada por *Olpidium* spp.

## 5.5 Hipótesis

5.4.1 *Olpidium* spp. es capaz de infestar raíces de *Poncirus trifoliata*.

5.4.2 *Olpidium* spp. es capaz de infestar raíces de *Citrus lemon*.

5.4.3 *Olpidium* spp. es capaz de infestar raíces del híbrido *Citrus sinensis* L. (naranja dulce Pineapple, NDP).

5.4.4 *Olpidium* spp. es capaz de infestar raíces del híbrido *Citrangue troyer*.

5.4.5 *Olpidium* spp. es capaz de adquirir CPsV *in vivo*.

5.4.6 *Olpidium* spp. es capaz de transmitir CPsV a las raíces de *Poncirus trifoliata*.

## 5.6 Resultados

### 5.6.1 Presencia de *Olpidium spp.* en raíces de *Citrus lemon*, *Poncirus trifoliata*, *Citrus sinensis* L. y *Citrange troyer*

#### 5.6.1.1 Optimización del procedimiento de extracción de zoosporas y su detección

Como control positivo y para optimizar la técnica de PCR para la detección de *Olpidium spp.*, se usaron aislamientos locales del hongo presentes en plantas de *L. sativa* (variedad criolla) recolectadas de la zona hortícola de La Plata, Provincia de Buenos Aires, que presentaban síntomas de big-vein (Lot *et al.*, 2002). La presencia de MLBVV en las hojas de estas plantas fue confirmada por RT-PCR (Barcala Tabarozzi *et al.*, 2010) indicando que el vector *O. virulentus* debía estar presente en sus raíces.

Para evaluar la presencia de *Olpidium spp.* en dichas raíces se realizaron extracciones de DNA total a partir de raicillas seleccionadas aleatoriamente. En estas extracciones la concentración de DNA de *Olpidium spp.* resultó insuficiente para ser detectado por la técnica de PCR (Capítulo Materiales y Métodos). Esto se debe a que la distribución del hongo en las raíces es heterogénea. Por lo tanto, fue necesario realizar una selección del material de partida para las extracciones de DNA mediante observaciones al microscopio óptico sin tinción como se muestra en la Figura 6. Se tomaron sólo aquellas raicillas en las que se observaron estructuras similares a talos dentro de las células (Figura 6B).

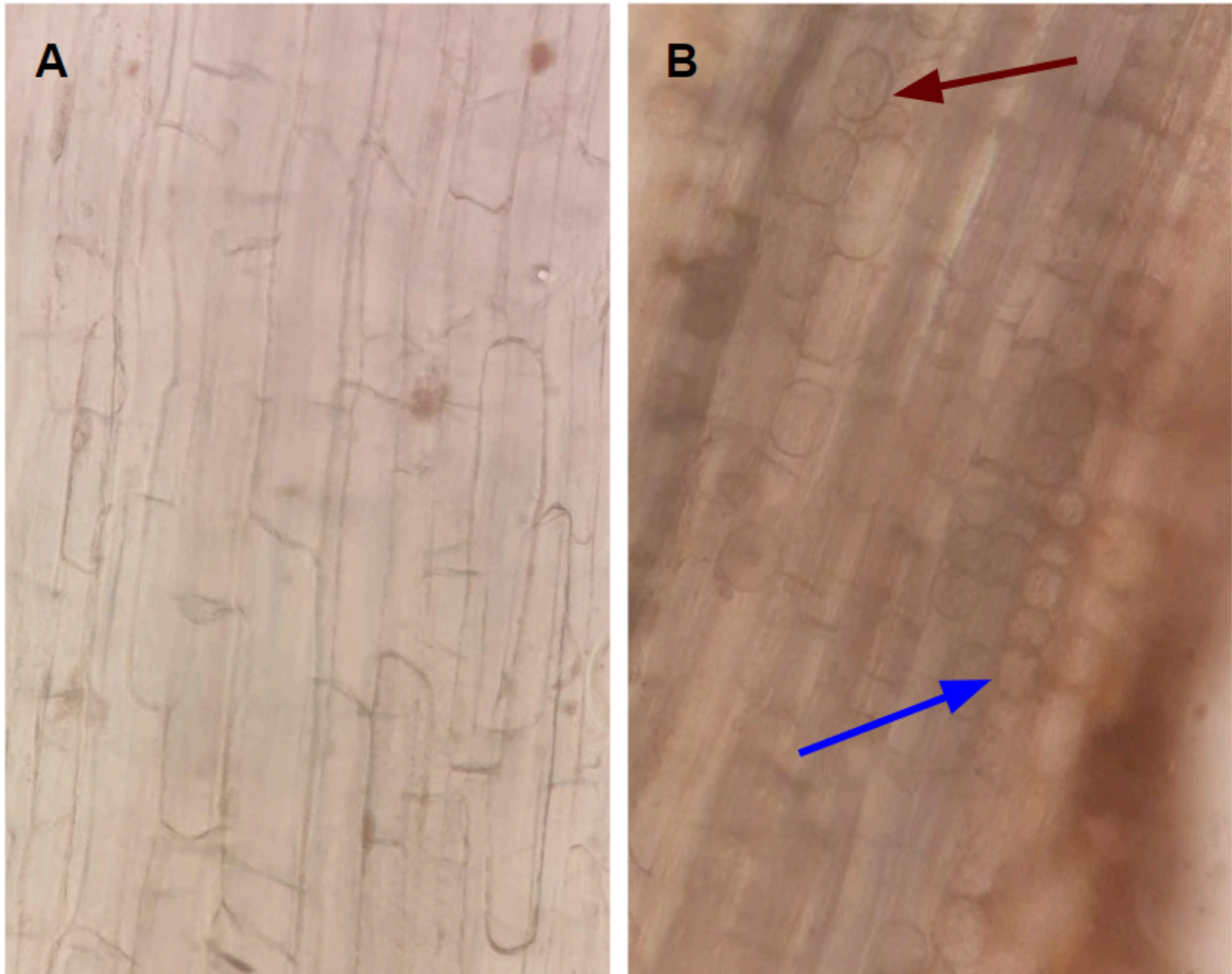


Figura 6: (A) Raíces de una planta de *L. sativa* sana, observándose las células oblongas sin contenido visible. (B) Raíces de *L. sativa* colonizada por *O. virulentus*. La flecha roja señala células conteniendo talos con contenido de aspecto granular. La flecha azul señala células conteniendo múltiples zoosporas que pueden ser liberadas al medio (microscopio óptico, aumento 10x).

Para la detección de *Olpidium* spp. en estos extractos se utilizaron los cebadores ya mencionados diseñados por Herrera-Vásquez *et al.* (2009). Se trata de cebadores que hibridan en un ITS diseñados de manera tal que permiten distinguir entre *O. virulentus*, *O. bornovanus* y *O. brassicae* (como se describe en el Capítulo Materiales y Métodos). Como se muestra en la Figura 7 la reacción amplificó un único fragmento del tamaño esperado para la especie *O. virulentus* (579 pares de bases). Para confirmar este resultado, el fragmento obtenido por PCR fue secuenciado confirmando que se trataba de *O. virulentus* (secuencia almacenada en la base de datos de NCBI, presentando un porcentaje de identidad del 99,81% y un e-value menor a  $e^{-99}$ ).

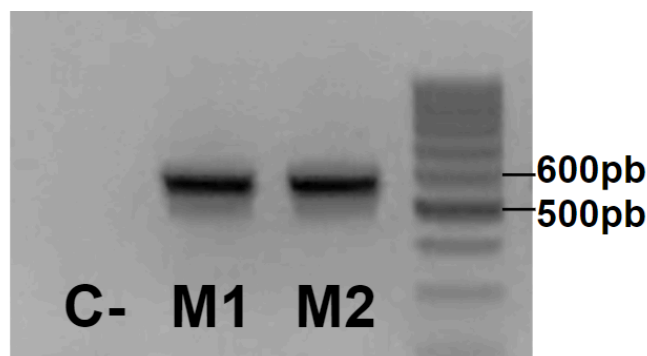


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a partir de extractos de DNA total de raicillas de *L. sativa* que presentaban talos en sus células (muestras M1 y M2) y el control negativo correspondiente a DNA total extraído de raíces de *L. sativa* sanas (C-).

Para utilizar esta fuente de *O. virulentus* como control positivo fue necesario multiplicar el hongo. Para eso se colocaron 5-10g de tierra con raicillas en macetas de 500 mL, completando el volumen con sustrato comercial esterilizado dos veces consecutivas en autoclave y colocando en ellas plántulas de *L. sativa*, variedades criolla y morada. Se observó que la variedad morada presentaba síntomas de big-vein más intensos, su crecimiento se vio disminuido y se notó que en sus raíces se encontraba mayor número de talos que en las muestras provenientes de la variedad criolla. Por esto se continuó con plantines de esta variedad como control positivo para *O. virulentus*.

Se aplicó el mismo procedimiento de selección en base a observaciones con microscopio óptico sin tinción a muestras de raíces de cítrico recolectadas del campo de la Empresa Ayuí en Concordia, Entre Ríos. Se trata de árboles de una variedad de *C. sinensis* (naranja verano, NV) injertados sobre un pie de *C. troyer*. A pesar de seleccionar las raicillas más jóvenes y delgadas, cuando se realizaron las observaciones se encontró que las paredes de sus células se encontraban lignificadas, lo que sólo permitió la observación del contenido celular en aquellas células de la epidermis que se encontraban en crecimiento activo en la porción de la raíz sin depósito de lignina, como se muestra en la Figura 8. Debido a esto, la cantidad de material seleccionada fue muy baja y de las extracciones no se obtuvo suficiente DNA como para la detección de *Olpidium* spp.

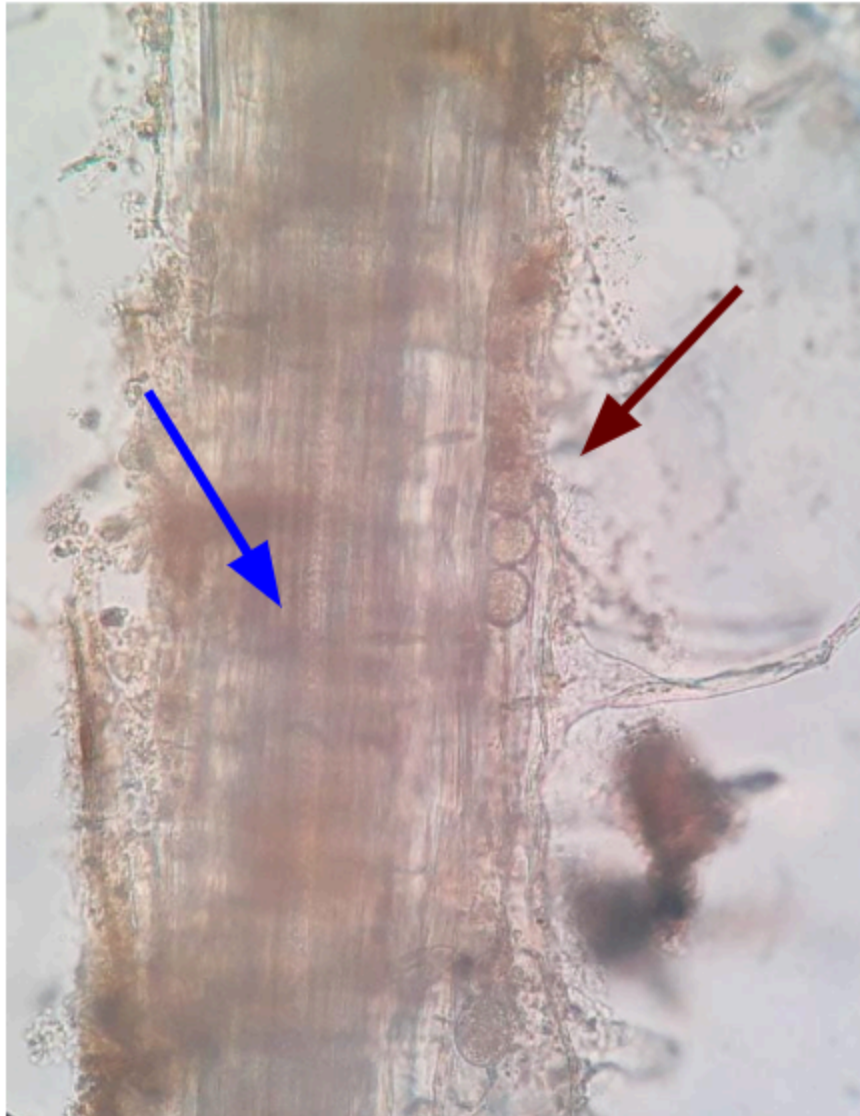


Figura 8: Observación al microscopio óptico de raíces de *P. trifoliata* recolectadas del campo de la Empresa Ayui, Concordia, Entre Ríos. Flecha roja: células epiteliales de raíz con talos de contenido de aspecto granular en su interior. Flecha azul: células de la raíz lignificadas donde no se puede visualizar el contenido celular (aumento 10x).

Por este motivo se aplicó un protocolo para concentrar zoosporas a partir de raíces colonizadas por *Ospidium* spp., modificado de Herrera-Vásquez *et al.* (2009), que se esquematiza en la Figura 9. Para esto se utilizaron las raíces de plantas de NDP, *Citrus lemon* (limón rugoso, LR), *C. troyer* y *P. trifoliata* cultivadas en invernáculo.



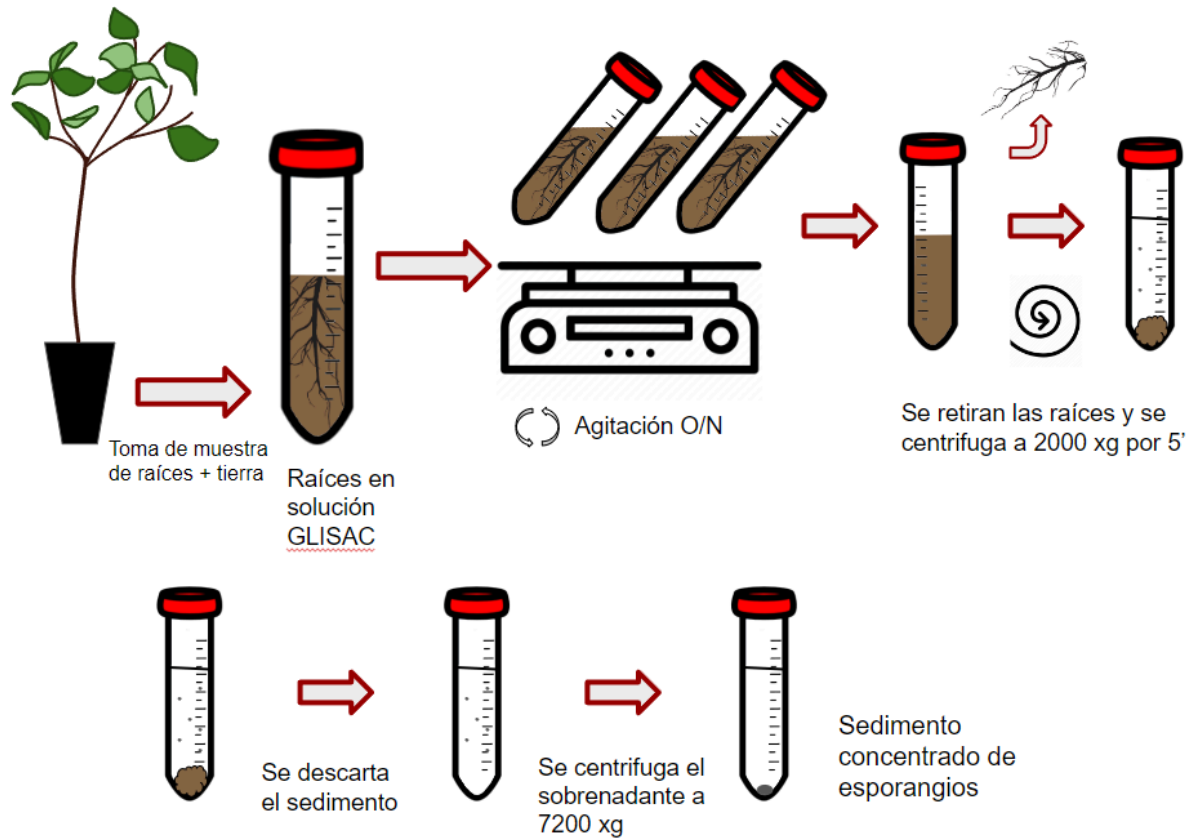


Figura 9: Esquema del procedimiento aplicado para la extracción y concentración de zoosporas.

Como se muestra en la Figura 10 se colocaron entre 15 y 50 g de raíces de cítrico frescas y en activo crecimiento en tubos falcon de 50mL conteniendo una solución de glicina (0.05M) y sacarosa (1% p/v) (solución GLISAC). Los tubos se mantuvieron a 4°C y en agitación a 70 rpm durante 8-12 horas.



Figura 10: Selección de raíces jóvenes y concentración de zoosporas de *Olpidium* spp. A: raíces de NDP expuestas al aire. B: muestras de raíces de NDP en solución GLISAC, en agitación.

Posteriormente se retiraron las raíces y se realizaron 1 ó 2 centrifugaciones a 2000 xg durante 5 minutos, dependiendo del aspecto del sobrenadante (turbidez y color). El sobrenadante contiene zoosporas, restos de tejido y de células en suspensión mientras que el sedimento, que es descartado, contiene fragmentos de raíz (mayoritariamente lignificadas) y tierra que se desprendió de ellas debido a la agitación. Para concentrar las zoosporas el sobrenadante fue centrifugado a 7200 xg durante 3 horas.

Se obtuvieron sedimentos como el que se muestra en la Figura 11. Se realizaron observaciones al microscopio óptico de alícuotas de los distintos sedimentos obtenidos donde se visualizaron restos de tierra, sin observarse estructuras similares a esporangios, esporas de resistencia ni zoosporas flageladas. Aun así, a partir de estos concentrados de zoosporas se realizaron extracciones de DNA y RNA total para analizar la presencia de *Olpidium* spp. y de CPsV mediante las técnicas de PCR y RTqPCR, respectivamente.



Figura 11: Sedimento conteniendo zoosporas.

Es importante señalar que a lo largo de estos experimentos sólo se detectó *O. virulentus* en las raíces de las plantas analizadas (tanto cítricos como ambas variedades de *L. sativa*) sin detectar en ninguna de ellas las especies *O. bornovanus* y *O. brassicae*.

### 5.6.2 Adquisición de CPsV por zoosporas de *Olpidium spp.*

Se confirmó la presencia de *Olpidium spp.* en todos los concentrados de zoosporas obtenidos mediante extracción de DNA y reacción de PCR con los cebadores ya mencionados. Para determinar la capacidad de estas zoosporas de adquirir CPsV es necesario evaluar la presencia del virus en dichos concentrados.

Se debe tener en cuenta que en estos concentrados también pueden encontrarse células radiculares enteras que podrían contener virus. Teniendo en cuenta esto, en la Figura 12 se esquematizan los posibles contenidos del sedimento. La detección de CPsV podría darse tanto por la presencia del virus dentro del esporangio como también en células epiteliales enteras, pero no en restos celulares debido a la inestabilidad de los viriones y RNAs virales en estas condiciones. Por lo tanto, para discriminar entre estas situaciones se determinó la presencia de células radiculares enteras en los sedimentos de zoosporas analizando la integridad de mRNAs de genes conservados y de expresión constante en células vegetales (genes *housekeeping*) en todos los extractos de RNA del concentrado de zoosporas.

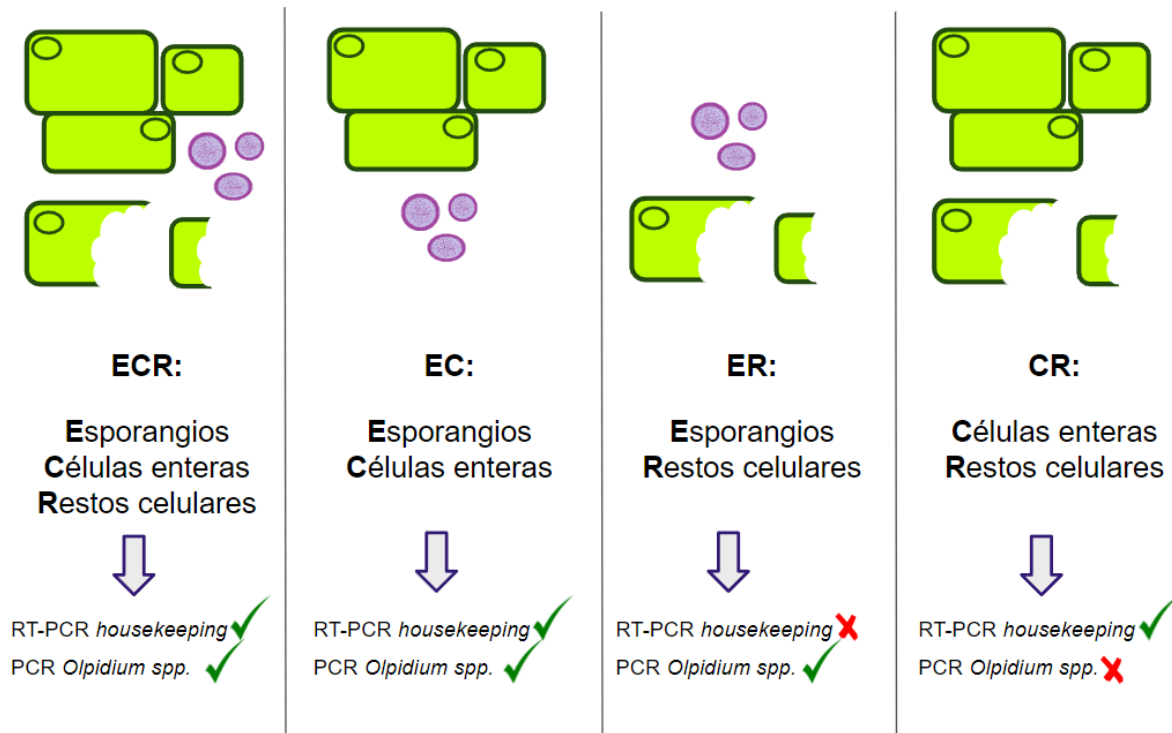


Figura 12: Esquema de los cuatro distintos contenidos posibles en extractos de zoosporas concentrados (ECR, EC, ER y CR).

Como se ha mencionado, las especies cítricas se cultivan sobre un pie o patrón. En la región del NEA se usan trifoliados como *P. trifoliata* y *C. troyer*. Para abarcar diferentes especies de cítricos y patrones, se realizaron extractos de zoosporas de 10 plantas. 3 individuos sanos: 1 NDP, 1 LR y 1 *P. trifoliata*; 5 infectados por injerto con CPsV 90-1-1: 1 NDP, 2 LR, 1 *P. trifoliata* y finalmente 2 infectados por injerto con CPsV 243-7 1 NDP y 1 LR.

Cada muestra de concentrado de zoosporas se dividió en 2 partes iguales para realizar las extracciones de DNA y RNA total con el fin de determinar la presencia de zoosporas, CPsV y células vegetales enteras. Para el caso de la determinación de células enteras se usaron los cebadores de tres genes de *housekeeping*: actina, Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) y ubiquitina (Boava *et al.*, 2011) para la síntesis de cDNA y PCR.

Brevemente, la actina tiene un rol fundamental estructural en células eucarióticas, además de ser necesaria para múltiples procesos celulares como la forma de la célula, permitir su desarrollo y movimiento, expresión génica, transducción de señales y respuesta a estrés biótico y abiótico. GADPH es una enzima catalítica involucrada en el

proceso de glicólisis, presente en el citoplasma. Ubiquitina es una proteína reguladora de tamaño pequeño que se encuentra en la mayoría de los tejidos de organismos eucariontes, de lo que deriva su nombre (Nelson y Cox, 2017).

Un resultado positivo de la reacción de PCR para cualquiera de estos tres genes indica la presencia de células enteras dentro del concentrado de zoosporas, ya que la estabilidad de los mRNAs celulares es muy baja fuera de la célula y es aún menos estable en las condiciones de la muestra de tierra por su contenido de RNAsas.

En estos ensayos se detectó *O. virulentus* en todas las muestras de concentrados de zoosporas analizadas, indicando que el hongo es capaz de colonizar raíces de las especies e híbridos de cítricos utilizados en estos experimentos. De todas estas muestras en sólo 4 de ellas se detectó tanto *O. virulentus* como CPsV sin detectarse ninguno de los tres genes *housekeeping* (Figura 12, tipo de muestra ER). Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 1 y la Figura 13.

Tabla 1: Resultados de la detección de CPsV y genes housekeeping a partir de extractos de RNA total de concentrado de zoosporas.

Muestra \ RT-PCR	NDP (sano)	LR CPsV 90-1-1	<i>P. trifoliata</i> CPsV 90-1-1	LR CPsV 243-7	NDP CPsV 243-7
CPsV (RTqPCR)	-	+	+	+	+
GADPH	-	-	-	-	-
ACTIN	-	-	-	-	-
UQ	-	-	-	-	-

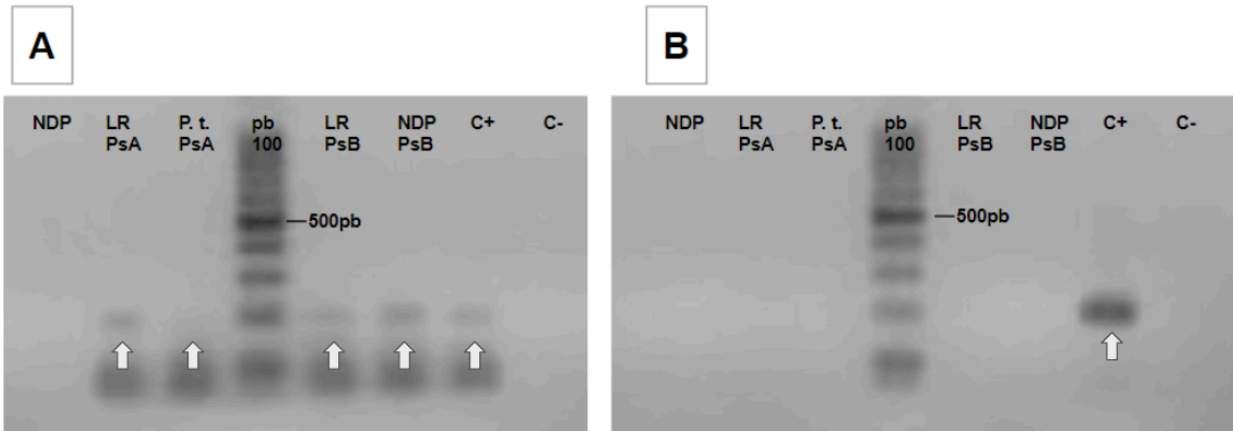


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RT-PCR a partir de extractos de RNA total de concentrado de zoosporas, las flechas señalan los fragmentos obtenidos. A: RTqPCR realizada con cebadores específicos de CPsV. B: RT-PCR realizada con cebadores UQ (los demás genes housekeeping arrojaron el mismo resultado). Las calles corresponden a extractos de zoosporas de raíces de: NDP: NDP sano. LR PsA: LR infectado con CPsV 90-1-1. P. t. PsA: *P. trifoliata* infectado con CPsV 90-1-1 (muestra positiva por RTqPCR, aunque en esta imagen no se visualiza la banda con bromuro de etidio). Pb100: marcador de peso molecular, la banda señalada corresponde a 500 pb. LR PsB: LR infectado con CPsV 243-7. NDP PsB: NDP infectado con CPsV 243-7. C+: control positivo. C-: control negativo realizado con agua en lugar de DNA molde.

CPsV no es capaz de permanecer estable fuera de la célula vegetal a temperatura ambiente en un extracto de tejido vegetal, probablemente debido al alto contenido de RNAsas celulares que se vuelcan en el extracto y a la inestabilidad de las partículas virales de CPsV frente al ataque de nucleasas (García *et al.*, 1991). Lo mismo ocurre con las especies de mRNAs celulares liberados al romperse la célula. Aún así, para confirmar la inestabilidad de estos RNAs en esas condiciones, se realizó un ensayo control partiendo de un concentrado de esporas proveniente de una planta sana al que se le agregó 1 ug de RNA total de material vegetal proveniente de hojas de un NDP infectado con CPsV 90-1-1. El resultado de la RTqPCR de CPsV fue negativo, mostrando que el RNA viral, o sus fragmentos, bajo estas condiciones es muy inestable.

## 5.6.2 Transmisión de CPsV mediada por concentrados de zoosporas de *O. virulentus*

Para determinar la capacidad de *Olpidium* spp. de transmitir CPsV a plantas sanas, se realizaron 2 ensayos. En el ensayo 1 se utilizó un inóculo de *O. virulentus* concentrado de la manera descrita extraído de raíces de plantas infectadas con CPsV. En el ensayo 2, basado en el trabajo de Shands *et al.* (2017), se regaron plantines sanos con el agua que cuele de macetas conteniendo plantas infectadas con CPsV.

Es importante señalar que al momento de realizar los concentrados de zoosporas se tomaron raíces de NDPs certificados libres de enfermedades generosamente cedidos por el grupo de trabajo del INTA-Concordia, Entre Ríos, que fueron mantenidos en invernáculo y cultivados en sustrato previamente esterilizado. Se esperaba que las raíces de estas plantas se encontraran libres de *Olpidium* spp. Sin embargo, en todos los cítricos analizados en este trabajo de tesis se detectó la presencia de *O. virulentus*.

Por esto, en los ensayos de transmisión descritos a continuación no se contó con una planta infectada con CPsV pero sin la presencia de *O. virulentus* en sus raíces. Una planta de estas características constituye el control necesario para determinar que *O. virulentus* es el vector de transmisión de CPsV y descartar a cualquier otro posible agente de transmisión presente en el sustrato.

### 5.6.2.1. Ensayo 1 de transmisión

Se decidió evaluar la capacidad de los concentrados de *O. virulentus* para transmitir CPsV. Estos se obtuvieron repitiendo el procedimiento descrito para la concentración de esporas a partir de nuevas muestras de NDP, LR, *C. troyer* y *P. trifoliata* (plantas fuente). Todas las plantas fuente seleccionadas para este ensayo para la extracción y concentración de zoosporas habían sido evaluadas previamente y había sido confirmada la presencia de *O. virulentus* en sus raíces.

Se obtuvieron concentrados provenientes de plantas sanas, plantas infectadas con CPsV 90-1-1 y plantas infectadas con CPsV 243-7. Se colocaron los concentrados en contacto directo con las raíces de plantines de *P. trifoliata* de 4 meses de edad durante 12 horas (Figura 14).

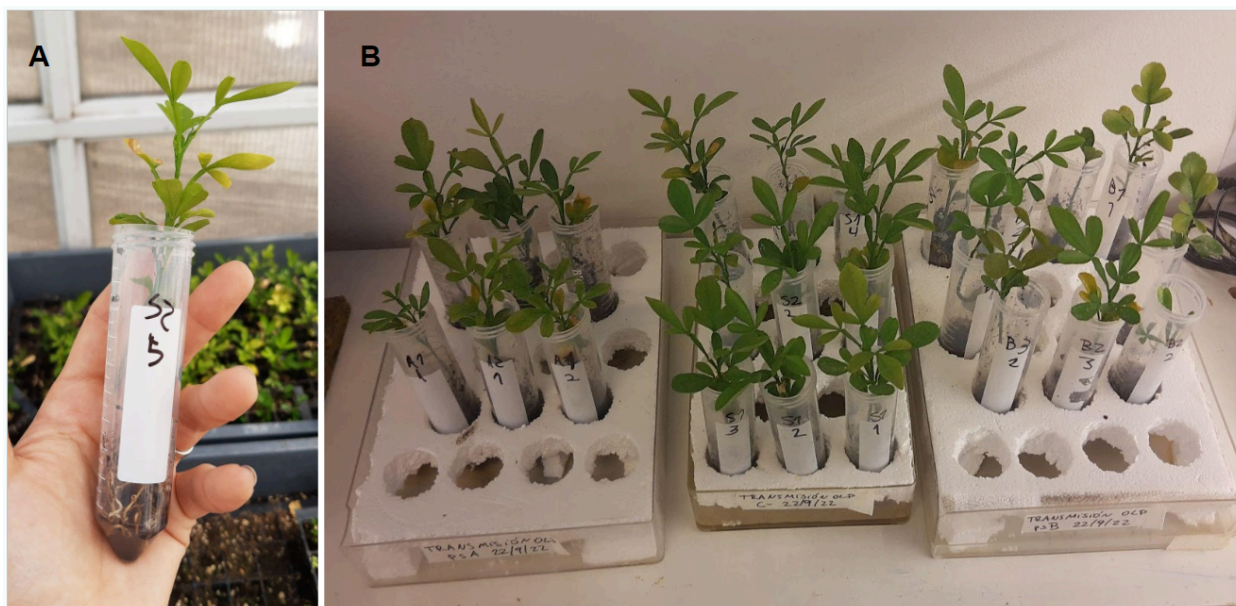


Figura 14: A: Raíces de *P. trifoliata* en contacto con sedimento concentrado de zoosporas de *Olpidium* spp. B: Plantines de *P. trifoliata* cuyas raíces se encuentran en contacto con concentrado de zoosporas de *Olpidium* spp. Las muestras se separaron en bandejas conteniendo plantines inoculados con extractos de plantas sanas, plantas infectadas con CPsV 90-1-1 y plantas infectadas con CPsV 243-7.

Luego de transcurridas 12 horas se agregó sustrato comercial esterilizado 2 veces consecutivas en autoclave a cada tubo y se perforó el fondo para permitir el drenaje de las aguas de riego. Al cabo de 2 semanas se trasladó el contenido de cada tubo a macetas de plástico individuales de 500 mL. Se completó este volumen con sustrato comercial esterilizado 2 veces consecutivas en autoclave, colocándolo alrededor del contenido del tubo.

En total se utilizaron 23 plantines: 9 inoculados con concentrados de zoosporas provenientes de 2 plantas sanas certificadas libres de enfermedades (grupo de muestras S), 6 inoculados con concentrados provenientes de 3 plantas infectadas con PsA (grupo A) y 8 inoculados con concentrados provenientes de 3 plantas infectadas con PsB (grupo B).

Estos plantines fueron regados con agua destilada dos veces por semana y nutridos con el producto comercial bas-foliar cada 21 días. Se mantuvieron durante 6 meses antes de ser analizados.



Para determinar la presencia de CPsV en los plantines se realizaron extracciones de RNA total y análisis por RTqPCR en raíz y hoja. Para determinar la presencia de *Olpidium spp.* en raíz se realizaron concentraciones de zoosporas, extracción de DNA y PCR de la manera ya descrita.

Se obtuvo por PCR el fragmento de DNA del tamaño correspondiente a *O. virulentus* en todas las muestras de plantines y se detectó CPsV en dos de las muestras de concentrado de zoosporas. Una de ellas pertenece al grupo de muestras B en la que también se detectó el gen de Ubiquitina del cítrico, indicando presencia de células enteras de raíz en el concentrado (Figura 13, tipo de muestra ECR) y no se detectó CPsV en tejido foliar ni de raíz en esta planta.

La segunda muestra de concentrado de zoosporas donde se detectó CPsV se obtuvo al combinar los extractos de zoosporas suspendidas en solución GLISAC de muestras correspondientes al grupo A y al grupo B. Esta muestra se procesó de esta manera debido al bajo volumen de extracto en solución GLISAC. En esta muestra (denominada A/B) se detectó CPsV y no se detectaron los genes de *housekeeping*, indicando ausencia de células enteras de raíz (Figura 13, tipo de muestra ER). No se detectó presencia de CPsV en el material foliar o de raíz de ninguno de los plantines colonizados por *Olpidium spp.*, por lo que no hubo evidencia de transmisión del virus.

Este resultado indica que CPsV probablemente se haya encontrado en el interior de las esporas de *O. virulentus*, lo que sugiere que el hongo puede adquirir CPsV, como lo hace con otros ophiovirus, pero no se obtuvo evidencia de su transmisión.

#### 5.6.2.2. Ensayo 2 de transmisión

Para este ensayo se utilizaron como fuente de *Olpidium spp.* 3 de las plantas referidas en la Tabla 1 (plantas fuente), en las que la presencia de *O. virulentus* había sido confirmada por extracción y concentración de zoosporas y posterior extracción de DNA total y PCR. Por otro lado se prepararon 4 almácigos de *P. trifoliata* de 4 meses de edad. Estos almácigos fueron regados con el agua que cuela del riego de las plantas fuente, como se esquematiza en la Figura 15.

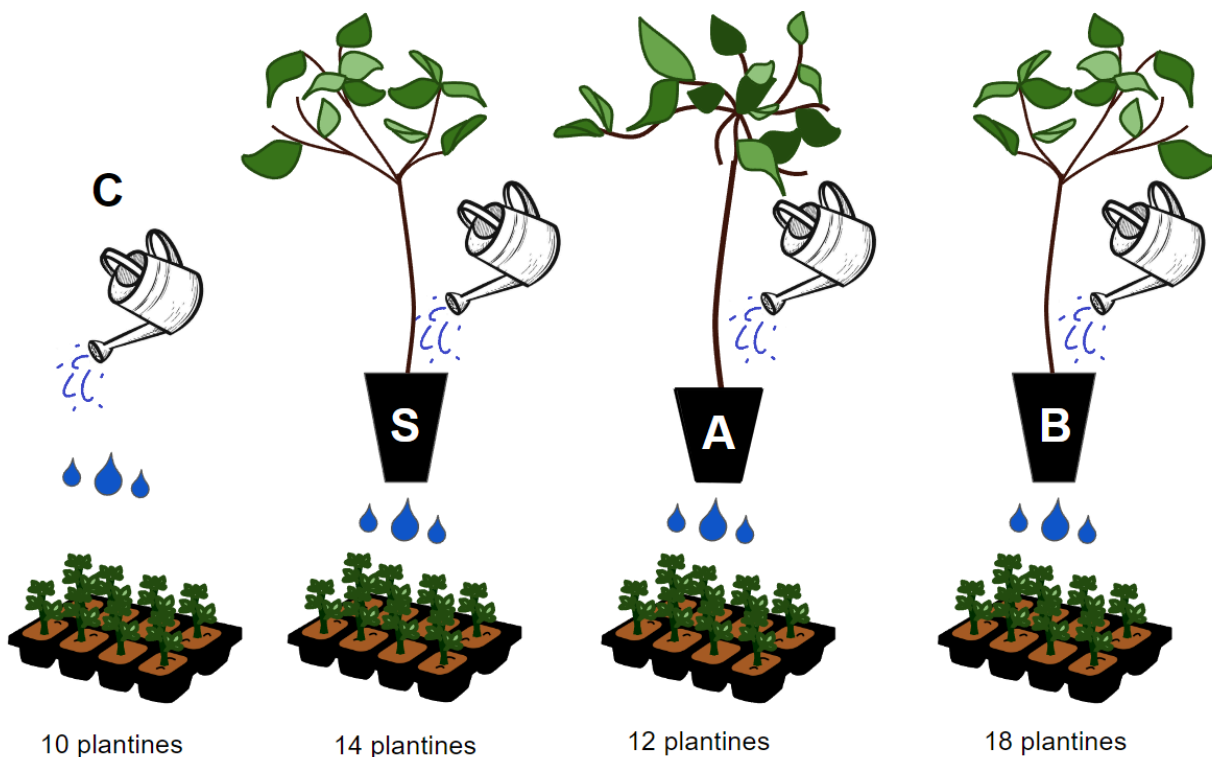


Figura 15: Esquema de riego del ensayo 2 de transmisión de CPsV por *Olpidium* spp.

Cada almácigo fue regado 2 ó 3 veces por semana durante 6 meses con el agua que cuele de la maceta al regar la planta fuente correspondiente. Los almácigos fueron mantenidos sobre rejilla metálica (Figura 16) para evitar el ingreso por capilaridad de otra fuente de agua.

Los almácigos utilizados fueron:

- Almácigo C (control sin *Olpidium* y sin CPsV), conteniendo 10 plantines que fueron regados con agua corriente.
- Almácigo S (control sin CPsV), con 14 plantines que fueron regados con el agua de riego que cuele de la maceta de un NDP sano (planta fuente S).
- Almácigo A, con 12 plantines regados con el agua que cuele de la maceta de un LR infectado con CPsV 90-1-1 (planta fuente A).
- Almácigo B con 18 plantines regados con el agua que cuele de un NDP infectado con CPsV 243-7 (planta fuente B).



Figura 16: De izquierda a derecha, almácigos S, A y B con plantines de *P. trifoliata* regados con el agua que cuele del riego de plantas sanas e infectadas con CPsV 90-1-1 y CPsV 243-7, respectivamente.

Al cabo de dos semanas de iniciado el experimento cada plantín fue trasladado a una maceta individual de 500 mL donde se completó este volumen con sustrato comercial esterilizado dos veces consecutivas en autoclave y se mantuvo la modalidad de riego durante 6 meses. Luego, durante la semana anterior a la toma de muestras todos los plantines fueron regados con agua corriente para asegurar que las detecciones de CPsV y *Olpidium* spp. no fueran contaminadas por material presente en el agua proveniente de las plantas fuente, como podrían ser restos de tejido o células enteras infectadas con CPsV.

Luego de 7 días de riego con agua corriente se realizaron extracciones de RNA total en muestras de material foliar joven y secciones de raíz para determinar la presencia de CPsV. Se obtuvieron y analizaron los extractos de concentrados de zoosporas de muestras de raíz de cada uno de los plantines, confirmando la presencia de *O. virulentus* en todos los plantines, excepto en 8 de los 10 plantines del grupo C.

Cuando se analizó la presencia de CPsV en las mismas muestras de concentrado de zoosporas, sólo una muestra correspondiente al grupo A fue positiva para CPsV. En esta muestra no se detectaron los mRNA de los genes *housekeeping* de cítrico, indicando ausencia de células enteras de raíz por lo que se evidencia la adquisición del virus por *O. virulentus*. Sin embargo, no se evidenció transmisión, ya que no se detectó a CPsV en el material foliar o en la raíz de este plantín ni en el resto de los plantines,

Como ya se mencionó, en estos ensayos no se contó con una planta infectada con CPsV pero sin la presencia de *O. virulentus* en sus raíces. Una planta de estas características constituye el control necesario para determinar que *O. virulentus* es el vector de transmisión de CPsV y descartar a cualquier otro posible agente de transmisión presente en el sustrato.

## 5.7 Discusión

En total en este trabajo de tesis se analizaron las raíces de 64 cítricos e híbridos de cítricos. Se contó con plantas tanto de campo como de invernáculo y vivero, y se incluyeron diversas variedades e híbridos de cítricos. En ninguna de ellas se detectó a las especies *O. bornovanus* ni *O. brassicae*, indicando que éstas no son capaces de invadir células de raíz de cítrico, o que al menos no están presentes en proporción suficiente para que la técnica de PCR aplicada permita detectarlas. Este resultado es coincidente con los antecedentes del resto de los ophiovirus (excepto RWMV, para el cual no hay estudios), para los cuales está demostrado la colonización de *O. virulentus* en las plantas hospedantes, además de ser el vector de transmisión..

*Oplidium* spp. se encuentra presente en los suelos utilizados para la producción citrícola en distintas partes del mundo y antecedentes como los de Palle *et al.* (2005) muestran la presencia de un hongo de morfología similar en suelos de campo donde se cultivan cítricos. La bibliografía no reporta otro factor o parásito que sea capaz de infectar raíces que comparta estas características con *Oplidium* spp., lo que refuerza la hipótesis de que éste sería el vector de transmisión.

En los experimentos realizados en esta tesis se analizó la presencia de CPsV y de células enteras en concentrados de zoosporas. En 5 muestras se encontró la situación señalada como ER en la Figura 12, es decir, se encontró presencia de *O. virulentus* sin detectar mRNAs de genes de *housekeeping* indicando ausencia de células enteras. En 4 de estas muestras se detectó a CPsV (la muestra restante provenía de una planta sana certificada libre de enfermedades), indicando que los viriones debían estar asociados a algún factor del medio ya que estas partículas virales son sumamente inestables fuera de la célula. La ausencia de mRNAs de los genes de *housekeeping* indican que CPsV no se encuentra dentro de células vegetales enteras que podrían haberse desprendido de la raíz durante el proceso de concentración de zoosporas.

En el Ensayo 1 de transmisión la inoculación de los plantines fue realizada con un solo inóculo de concentrado de zoosporas al inicio del experimento. Estos plantines fueron mantenidos durante seis meses siendo regados con agua corriente sin inocularse nuevamente. Sabiendo que la infectividad del virus libre (sin asociarse a algún vector) baja drásticamente al cabo de unos pocos minutos (García *et al.*, 1991), es muy poco probable que hubiera sobrevivido fuera de las células de los plantines durante los seis meses de duración del ensayo. Si bien no se detectó CPsV en el material vegetal de los plantines, los 2 resultados positivos se deben a la asociación del virus a algún factor del suelo que le otorgó protección durante el transcurso del ensayo.

En el Ensayo 2 de transmisión se detectó CPsV en el concentrado de zoosporas obtenido de un único plantín. Para este caso es muy poco probable que el resultado se deba a células infectadas enteras provenientes de la planta fuente, ya que el plantín había sido regado con agua corriente durante los 7 días previos a la toma de muestra. Por lo tanto, este resultado sugiere fuertemente que CPsV se encontraba asociado a algún factor del suelo que le brindaba estabilidad frente a nucleasas y proteasas presentes en el medio.

Estos resultados sugieren fuertemente que la fuente de CPsV son las esporas de *O. virulentus* y por ende que este hongo puede adquirir el virus. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten afirmar esto de manera concluyente ya que no se descarta la presencia de otros hongos o nematodos que pudieran adquirir el virus que, si bien no se observaron, tampoco se buscaron mediante otros métodos de detección que permitiría descartarlos.

En otros sistemas de estudio, incluyendo los realizados con los ophiovirus FreSV, LRNV, MLBVV, TMMMV y BluMaV (Dorst, 1975; Campbell y Lot, 1996; Lot *et al.*, 2002; Morikawa *et al.*, 1997; Shands *et al.*, 2017) no se realizaron este tipo de análisis porque la hipótesis fue confirmada con experimentos de transmisión, *id est*, encontrando el virus en la parte aérea de la planta y observando el desarrollo de la enfermedad de la cual es el agente causal.

Nuevamente, en este trabajo de tesis no se contó con plantas de cítrico que no posean *O. virulentus* en sus raíces, algo que hubiera sido necesario para reproducir el diseño del experimento de Shands *et al.* (2017) y confirmar que *O. virulentus* es el factor de transmisión. Al momento de realizar los concentrados de zoosporas se tomaron raíces de NDPs certificados libres de enfermedades que fueron mantenidos durante todo su desarrollo en invernáculo y cultivados en sustrato previamente esterilizado, esperando no encontrar *Opidium* spp. en estas muestras. Sin embargo, se detectó *O. virulentus* en raíces de todas las plantas analizadas provenientes de campo, invernáculo y vivero.

Adicionalmente en el ensayo de transmisión 2 uno de los controles utilizados fue el grupo de plantines C, que fueron germinados en medios libres de sustrato y establecidos en sustrato comercial esterilizado dos veces consecutivas en autoclave y aún así se detectó presencia de *O. virulentus* en 2 de ellos (de un total de 10). Esto indica que zoosporas o, más probable, esporas de resistencia de *O. virulentus* sobrevivieron el proceso de esterilización del sustrato o bien se encontraban en el agua de riego o en el material (macetas de plástico, almácigos) utilizado.

Como ya se mencionó, CPsV puede permanecer latente dentro de la planta durante 10-15 años, por lo que los resultados negativos de los ensayos de transmisión no son concluyentes y las determinaciones de la presencia de CPsV deberán ser repetidas más adelante. Además, es menester destacar que existen diversas observaciones que señalan otros vectores de transmisión natural. La aparición de nuevos árboles enfermos en Uruguay, Texas (EEUU), Florida (EEUU) y Argentina ha sido aleatoria (Danos, 1990), lo que coincide con el patrón de transmisión de un vector alado. También es necesario considerar que es posible que CPsV sea transmitido por otro organismo. Se trae a colación como ejemplo el caso de los potyvirus, donde los diferentes géneros de la familia *Potyviridae* se transmiten por diferentes vectores (áfidos, mosca blanca y otros, Whitfield *et al.*, 2015), por lo que podría ser posible que CPsV tuviera un vector de transmisión distinto al del resto de los virus de la familia *Aspiviridae*.

## 5.8 Conclusiones

- *O. virulentus* es capaz de colonizar raíces de: *C. sinensis* (variedades NDP y MV), *C. lemon* (LR) y *P. trifoliata*.
- No se encontró evidencia de que las especies *O. bornovanus* ni *O. brassicae* sean capaces de colonizar raíces de *C. sinensis* (variedades NDP y MV), *C. lemon* (LR) ni *P. trifoliata*.
- Se sugiere fuertemente que CPsV es adquirido por zoosporas de *O. virulentus*.
- No se cuenta con evidencia de que *O. virulentus* sea vector de CPsV



## 5.9 Perspectivas

Para demostrar que *O. virulentus* es el vector de transmisión de CPsV sería necesario repetir el segundo ensayo de transmisión de esta tesis agregando un control adicional de una planta infectada con CPsV que no cuente con la presencia de *Olpidium* spp. en sus raíces. Durante el desarrollo de este trabajo de tesis, no se contó con plantas que no presentaran *O. virulentus* en sus raíces. Para obtener plantas de estas características es necesario tratar las semillas de partida con antifúngico, germinarlas en medio estéril y mantener las plántulas en condiciones que no permitan el acceso de zoosporas o esporas de resistencia de *O. virulentus*. Cuando alcancen el tamaño suficiente los plantines deberían ser inoculados por injerto con CPsV. Si bien las plantas recibidas de la EEA INTA-Concordia estaban cultivadas en sustrato esterilizado, las condiciones bajo las cuales fueron mantenidas permitieron el ingreso de *O. virulentus* a las macetas, o bien las condiciones de esterilización no fueron suficientes para eliminar las esporas de resistencia.

Los cítricos demoran mucho tiempo en desarrollarse, y para ser infectado por injerto un plantín de NDP debe tener entre 12 y 18 meses de edad. Para poder replicar el ensayo de Shands *et al.* (2017) sería necesario mantener una planta durante al menos un año en condiciones de, por ejemplo, hidroponía, lo que aseguraría que esporas de *Olpidium* spp. nunca entren en contacto con sus raíces. De esta manera se contaría con el control necesario para determinar que el factor de transmisión es *O. virulentus*: una planta infectada con CPsV pero sin *Olpidium* spp.. El agua que cuele del riego de esta planta se utilizaría como agua de riego para plantines sanos y, de ser *O. virulentus* el vector de CPsV, no se observaría transmisión a los plantines.

También resulta de interés seguir evaluando los plantines de ambos ensayos de transmisión, ya que hasta el momento CPsV no fue detectado en sus hojas ni raíces. Se sabe que la enfermedad puede demorar años en desarrollarse y la distribución del virus en la planta es heterogénea, por lo que sería necesario repetir las determinaciones de presencia de CPsV en la parte aérea al cabo de al menos un año. Alternativamente, se puede tomar material de los plantines de *P. trifoliata* utilizados en los ensayos de transmisión para injertar NDPs sanos y así estimular la multiplicación del virus en un cítrico que posee un crecimiento más vigoroso y es más sensible a CPsV que la especie utilizada. Luego de una poda y brotación se tomaría el material foliar joven y se realizaría la detección de CPsV. Para realizar esta multiplicación primero es necesario permitir a los plantines de *P. trifoliata* alcanzar el tamaño suficiente como para contar con suficiente material vegetal para realizar los injertos.

Otro ensayo que permitiría determinar la transmisión de CPsV por *O. virulentus* sería uno de transmisión por único esporangio, como el realizado por Campbell y Lot en 1996. Si bien se consideró incluir este ensayo en este trabajo de tesis, no se contaba con las herramientas para llevarlo a cabo.

# CONCLUSIONES GENERALES

- La concordancia (PABAK) entre resultados obtenidos por IB y RT-qPCR en el Capítulo 3 se encuentra dentro del rango interpretado como concordancia casi perfecta ( $\geq 0,8$ ), tanto para el caso del análisis de RT-qPCR vs IB como el de RT-qPCR vs S y O. Esto quiere decir que la técnica de RT-qPCR es equivalente al IB para el diagnóstico de la enfermedad psorosis.
- La presencia de resultados falsos positivos (tanto errores técnicos como infecciones asintomáticas) al aplicarse la RT-qPCR demuestran que esta técnica es más sensible que el IB.
- La ausencia de resultados falsos negativos por RT-qPCR demuestran que la técnica es altamente específica, como ya lo había demostrado De Francesco *et al.*, (2015).
- En el análisis estadístico comparativo entre IB y RT-qPCR los valores de PV+ y PV- adquirieron sus valores máximos, lo que indica que la técnica es altamente precisa. Esto se debe a la ausencia de resultados falsos negativos y falsos positivos.
- No se observó correlación entre la carga viral e intensidad de síntomas en material foliar de las plantas NDP de invernáculo utilizadas como indicadoras en el IB.
- La RT-qPCR permite identificar la presencia específica de CPsV, en contraste con el IB que sólo determina la presencia de una infección viral capaz de manifestar síntomas comunes a los agentes pertenecientes al “grupo psorosis”.

- La técnica de RT-qPCR ha sido valorada y validada como método de diagnóstico de la enfermedad psorosis de los cítricos.
- Bajo las condiciones aplicadas (fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperatura de 24±2°C) *T. citricida* es capaz de adquirir CTV con una tasa que va del 41 al 65% al alimentarse NDP infectado.
- El ensayo control de CTV permitió afirmar que las condiciones utilizadas en estos ensayos para el mantenimiento tanto de las plantas como de los insectos eran las adecuadas para la adquisición viral.
- *T. citricida* no es capaz de adquirir CPsV al alimentarse de NDP o LR infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de períodos de adquisición de 24h, 48h y 22 días con fotoperíodo de 10:14 – L:O y temperaturas entre 22 y 26°C.
- *T. citricida* es capaz de adquirir CPsV con una tasa del 0,35% al alimentarse de limón rugoso infectado con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de un período de adquisición de 10 días con régimen de luz natural a temperaturas entre 20 y 35°C.
- *A. gossypii* no es capaz de adquirir CPsV al alimentarse de naranja Valencia o *P. trifoliata* infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 luego de un período de adquisición de 10 días con régimen de luz natural y temperaturas de 20-35°C.
- *T. citricida* no es capaz de transmitir CPsV al alimentarse de NDP o LR infectados con CPsV 90-1-1, con un período de adquisición de 10 días con régimen de luz natural y temperaturas de 20-35°C, y con un período de transmisión de 7 días.
- *A. gossypii* no es capaz de transmitir CPsV al alimentarse de NDP, LR, naranja Valencia o *P. trifoliata* infectados con el aislamiento CPsV 90-1-1 manteniendo la cría durante 10 meses entre plantas infectadas y plantas libres de enfermedades bajo régimen de luz natural y temperaturas entre 20 y 35°C.
- *O. virulentus* es capaz de colonizar raíces de: *C. sinensis* (variedades NDP y MV), *C. lemon* (LR) y *P. trifoliata*.
- No se encontró evidencia de que las especies *O. bornovanus* ni *O. brassicae* sean capaces de colonizar raíces de *C. sinensis* (variedades NDP y MV), *C. lemon* (LR) ni *P. trifoliata*.

- Se sugiere fuertemente que CPsV es adquirido por zoosporas de *O. virulentus*.
- No se encontró evidencia que apoye a *O. virulentus* como vector de CPsV.
- En base a todos estos resultados se concluye que el método de detección de CPsV por RTqPCR puede ser aplicado al diagnóstico de psorosis de los cítricos, y que posee la sensibilidad suficiente para aplicarlo en experimentos de adquisición y transmisión del virus por vectores. Se ha detectado CPsV en *Olpidium virulentus*, lo que sugiere que este hongo podría ser el vector de transmisión. Por otro lado, aplicando este método altamente sensible, no se detectó CPsV en ensayos de adquisición y transmisión en los áfidos *T. citricida* ni *A. gossypii* sugiriendo que estos no son capaces de transmitirlo.

# REFERENCIAS

- Achachi, Asmae, Mohamed Haïssam Jijakli, Elmostafa El Fahime, Abdelmajid Soulaymani, and Mohammed Ibriz. "Detection of Citrus Psorosis Virus Using an Improved One-Step RT-PCR." *Arabian Journal for Science and Engineering* 40, no. 1 (January 2015): 7–13. <https://doi.org/10.1007/s13369-014-1490-z>.
- Agrios, G. (1996). *Fitopatología*. 2da Edición, Editorial Limusa, México
- Aist, J. R. & Israel, H. W. (1977). Timing and significance of papilla formation during host penetration by *Ospidium brassicae*. *Phytopathology*, 67, 187-194.
- Alioto D, Gangemi M, Deaglio S, Sposato P, Noris E, Luisoni E, Milne RG. 1999. Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 48:735-741.
- Alioto D, Guerri J, Moreno P, Milne RG. 2008. Citrus psorosis virus. In: Rao GP, Myrta A, Ling KS, editors. Characterization, diagnosis & management of P Moreno et al. / *Journal of Citrus Pathology* iocv\_journalcitruspathology\_28860 13/18 plant viruses. Houston (TX): Studium Press LLC. p. 69-96.
- Alioto D, Malfitano M, Troisi A, Peluso A, Martin S, Milne RG, Guerri J, Moreno P. 2003. Variability of the coat protein gene of Citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. *Arch Virol.* 148:2155- 2166.
- Alioto D, Troisi A, Peluso A, Quatrano G, Masenga V, Milne RG. 2000. Occurrence of Citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. *Eur J Plant Pathol.* 106:795-799.
- Anderson C (2000) Presentation on the Argentinean certification program. In: Proceedings of global citrus germplasm network, 7–8 Dec 2000
- Andika, Ida Bagus, Hideki Kondo, and Liying Sun. "Interplays between Soil-Borne Plant Viruses and RNA Silencing-Mediated Antiviral Defense in Roots." *Frontiers in Microbiology* 7 (September 15, 2016). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01458>.
- Angelella, G., V. Nalam, P. Nachappa, J. White, and I. Kaplan. "Endosymbionts Differentially Alter Exploratory Probing Behavior of a Nonpersistent Plant Virus Vector." *Microbial Ecology* 76, no. 2 (August 2018): 453–58. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1133-5>.
- Arwidsson, V.T., 1938. Über Asterocytis, Astrocystis und Asterocystis. *Bot. Not.* 190-192.
- Atta, Sagheer, Chang-yong Zhou, Yan Zhou, Meng-ji Cao, and Xue-feng Wang. "Distribution and Research Advances of Citrus Tristeza Virus." *Journal of Integrative Agriculture* 11, no. 3 (March 2012): 346–58. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60019-7](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60019-7).
- Ayllón, M. A., C. López, J. Navas-Castillo, S. M. Garnsey, J. Guerri, R. Flores, and P. Moreno. "Polymorphism of the 5' Terminal Region of Citrus Tristeza Virus (CTV) RNA: Incidence of Three Sequence Types in Isolates of Different Origin and Pathogenicity." *Archives of Virology* 146, no. 1 (January 31, 2001): 27–40. <https://doi.org/10.1007/s007050170188>.
- Barr, D.J.S., 1980. *Ospidium brassicae*. In: *Fungi Canadenses* No. 176. National Mycological Herbarium. Biosystematics Research Institute, Research Branch, Agriculture Canada, Ottawa, Canada.
- Barr, D.J.S., 2001. Chapter 5, chytridiomycota. In: McLaughlin, D., McLaughlin, E., Lemke, P. (Eds.), *Systematics and Evolution*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 93-112 .

- Barragan-Valencia G, Morales-Loredo A, Alvarez-Ojeda MG, Rio MAPD, Quintero-Zapata I. 2008. Quantitative diagnosis of citrus psorosis virus by real time RT-PCR. *Agrociencia*. 42:225-232.
- Barcala Tabarrozzi, A. E., E. J. Peña, E. Dal Bo, G. Robles Luna, C. A. Reyes, and M. L. Garcia. "Identification of Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus and Lettuce Big-Vein Associated Virus Infecting *Lactuca Sativa* with Symptoms of Lettuce Big-Vein Disease in Argentina." *Plant Pathology* 59, no. 6 (December 2010): 1160–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02289.x>.
- Barthe GA, Ceccardi TL, Manjunath KL, Derrick KS. 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *J Gen Virol*. 79:1531-1537.
- Belabess, Zineb, Tourya Sagouti, Naima Rhallabi, Abdessalem Tahiri, Sébastien Massart, Rachid Tahzima, Rachid Lahli, and M. Haissam Jijakli. "Citrus Psorosis Virus: Current Insights on a Still Poorly Understood Ophiovirus." *Microorganisms* 8, no. 8 (August 6, 2020): 1197. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081197>.
- Bensaude, M., 1923. A species of *Olpidium* parasitic in the roots of tomato, tobacco and cabbage. *Phytopathology* 13, 451-454.
- Beñatena HN, Portillo MM. 1984. Natural spread of psorosis in sweet orange seedlings. In: Garnsey SM, Timmer LW, Dodds JA, editors. Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 159- 164
- Beris, D., Malandraki, Ioanna., Nikon, Vassilakos., Ioannis, Theologidis., Aggeliki, Rampou., Oxana, Kektsidou., Sébastien, Massart., Christina, Varveri. (2021). Association of Citrus Virus A to Citrus Impietratura Disease Symptoms.. *Phytopathology*, doi: 10.1094/PHYTO-01-21-0027-R
- Bian, Ruiling, Ida Bagus Andika, Tianxing Pang, Ziqian Lian, Shuang Wei, Erbo Niu, Yunfeng Wu, Hideki Kondo, Xili Liu, and Liying Sun. "Facilitative and Synergistic Interactions between Fungal and Plant Viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117, no. 7 (February 18, 2020): 3779–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1915996117>.
- Boava, Leonardo P, Mariângela Cristofani-Yaly, Valéria S Mafra, Karen Kubo, Luciano T Kishi, Marco A Takita, Marcelo Ribeiro-Alves, and Marcos A Machado. "Global Gene Expression of *Poncirus Trifoliata*, Citrus Sunki and Their Hybrids under Infection of *Phytophthora Parasitica*." *BMC Genomics* 12, no. 1 (December 2011): 39. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-39>.
- Boddy, Lynne. "Fungi, Ecosystems, and Global Change." In *The Fungi*, 361–400. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00011-6>.
- . "Genetics – Variation, Sexuality, and Evolution." In *The Fungi*, 99–139. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00004-9>.
- . "Interactions Between Fungi and Other Microbes." In *The Fungi*, 337–60. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00010-4>.
- . "Interactions with Humans and Other Animals." In *The Fungi*, 293–336. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00009-8>.
- . "Pathogens of Autotrophs." In *The Fungi*, 245–92. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00008-6>.
- Bordin, Nicola, Ian Sillitoe, Jonathan G. Lees, and Christine Orengo. "Tracing Evolution Through Protein Structures: Nature Captured in a Few Thousand Folds." *Frontiers in Molecular Biosciences* 8 (May 10, 2021): 668184. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.668184>.

- Bos, L., and N. Huijberts. "Lettuce Ring Necrosis, Caused by a Chytrid-Borne Agent Distinct from Lettuce Big-Vein 'Virus.'" *European Journal of Plant Pathology* 102, no. 9 (November 1996): 867–73.  
<https://doi.org/10.1007/BF01877057>.
- Braendle, C, G K Davis, J A Brisson, and D L Stern. "Wing Dimorphism in Aphids." *Heredity* 97, no. 3 (September 2006): 192–99. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800863>.
- Bridges GD, Youtsey CO, Nixon RR. 1965. Observations indicating psorosis transmission by seed of Carrizo citrange. *Proc Fla State Hort Soc.* 78:48-50.
- Bransky, R. H., V. D. Damsteegt, D. S. Howd, and A. Roy. "Molecular Analyses of *Citrus Tristeza Virus* Subisolates Separated by Aphid Transmission." *Plant Disease* 87, no. 4 (April 2003): 397–401.  
<https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.4.397>.
- Brunt, A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M.J., Gibbs, A.J., Watson, L. and Zurcher, E.J. (1996) Plant Viruses Online:descriptions and lists from the VIDEo database. Version: 20 August 1996. <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/>
- Byrt, T., Bishop, J., and Carlin, J. B. 1993. Bias, prevalence and kappa. *J. Clin. Epidemiol.* 46:423-429.
- Campbell, R. N. "Cultural Characteristics and Manipulative Methods." *Viruses with Fungal Vectors*, 1988, 153–65.
- Campbell, R. N. (1985). Longevity of *Olpidium brassicae* in air-dry soil and the persistence of the lettuce big-vein agent. *Canadian Journal of Botany*, 63, 2288-2289.
- Campbell, R N, R G Grogay, and K A Kimbli. "BIG VEIN OF LETTUCE," 1964.
- Campbell, R.N., and P.R. Fry. "The Nature of the Associations between *Olpidium Brassicae* and Lettuce Big-Vein and Tobacco Necrosis Viruses." *Virology* 29, no. 2 (June 1966): 222–33.  
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90028-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90028-6).
- Campbell, Robert N., and Hervé Lot. "Lettuce Ring Necrosis, a Viruslike Disease o Lettuce Evidence for Transmission by *Olpidium Brassicae*," 1996.
- Campbell, R.N., Sim, S.T., 1994. Host-specificity and nomenclature of *Olpidium bornovanus* (*Olpidium radicale*) and comparisons to *Olpidium brassicae*. *Can. J. Bot.* 72, 1136-1143.
- Campiglia, H. G., C. M. Silveira, and A. A. Salibe. "Psorosis Transmission through Seeds of Trifoliolate Orange." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 7, no. 7 (1976).  
<https://doi.org/10.5070/C50QK4F2HM>.
- Carr, John P., Alex M. Murphy, Trisna Tungadi, and Ju-Yeon Yoon. "Plant Defense Signals: Players and Pawns in Plant-Virus-Vector Interactions." *Plant Science* 279 (February 2019): 87–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.011>.
- Casafús, Carlos M., and Norma Beatriz Costa. "Recent Experiences and Studies on the Type of Psorosis from Concordia, Argentina." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 9, no. 9 (1984). <https://doi.org/10.5070/C549H2F34W>.
- Chalam, V C, and R K Khetarpal. "A Critical Appraisal of Challenges in Exclusion of Plant Viruses during Transboundary Movement of Seeds." *Indian J. Virol.* 19 (2008): 11.
- Chen, Hongming, Yan Zhou, Xuefeng Wang, Changyong Zhou, Xiuyan Yang, and Zhongan Li. "Detection of Citrus Yellow Vein Clearing Virus by Quantitative Real-Time RT-PCR." *Horticultural Plant Journal* 2, no. 4 (July 2016): 188–92. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2016.07.001>.
- Childs JFL, Johnson RE. 1966. Preliminary report of seed transmission of psorosis virus. *Plant Dis Repr.* 50:81-83.
- Cohen, J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20:37-46.



- Conover, W. J. *Practical Nonparametric Statistics*. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., 1999.
- Costa, N., Plata, M. I., & Anderson, C. (2004). VIII-Capítulo 7: Plantas cítricas libres de enfermedades. En: Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. (Eds.) *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. Ediciones INTA, Buenos Aires. p 317-318
- Costa, N, M I Plata, and F Ramos. "AERIAL SPREAD OF CITRUS PSOROSIS VIRUS (CPsV) BY INSECTS IN ARGENTINA," 2013, 1.
- Da Graca, J. V. "Comparison of Isolates of Citrus Ringspot, Psorosis, and Other Viruslike Agents of Citrus." *Plant Disease* 75, no. 6 (1991): 613. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0613>.
- Dang, Tyler. "A Study on HighThroughput Technologies for the Identification of Citrus Pathogens and the Characterization of Host Responses to Infections." University of California, Riverside, 2021. <https://escholarship.org/uc/item/28s7c169>.
- Dangeard, P.C., 1886. Recherches sur les organismes inferieurs. *Annales des sciences naturelles Botanique et biologie vegetale* 4, 241-341.
- Danós, E. "La Psorosis de Los Cítricos: La Epidemia En Curso En Argentina y El Desafío de Su Control" XXII, no. 1 (1990): 267–77.
- De Bruyn, Rochelle, Rachel Bester, Glynnis Cook, Chanel Steyn, Johannes H. J. Breytenbach, and Hans J. Maree. "Distribution and Genetic Diversity of *Coguvirus Eburi* in South African Citrus and the Development of a Real-Time RT-PCR Assay for Citrus-Infecting Coguviruses." *Plant Disease* 106, no. 8 (August 1, 2022): 2221–27. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-21-2409-RE>.
- De Francesco, A., M. Simeone, C. Gómez, N. Costa, and M. L. García. "Transgenic Sweet Orange Expressing Hairpin CP-mRNA in the Interstock Confers Tolerance to Citrus Psorosis Virus in the Non-Transgenic Scion." *Transgenic Research* 29, no. 2 (April 2020): 215–28. <https://doi.org/10.1007/s11248-020-00191-1>.
- De Francesco, Agustina, Norma Costa, María I. Plata, and María L. García. "Improved Detection of *Citrus Psorosis Virus* and Coat Protein-Derived Transgenes in Citrus Plants: Comparison Between RT-qPCR and TAS-ELISA." *Journal of Phytopathology* 163, no. 11–12 (December 2015): 915–25. <https://doi.org/10.1111/jph.12392>.
- De Francesco, Agustina. "Estudio Del Mecanismo de Resistencia de Plantas Transgénicas Híbridas de Citrus Sinensis Frente a Citrus Psorosis Virus," 2015.
- de Wildeman, E., 1893. Notes mycologiques III sur quelques champignons parasites dans les racines des phanerogames. *Annales de la Societe Belge de Microscopie*. 17, 12-32.
- Debat, Humberto, Maria Laura Garcia, and Nicolas Bejerman. "Expanding the Repertoire of the Plant-Infecting Ophioviruses through Metatranscriptomics Data." *Viruses* 15, no. 4 (March 25, 2023): 840. <https://doi.org/10.3390/v15040840>.
- Desjardins PR, Drake RJ, French JV. 1969. Transmission of citrus ringspot virus to citrus and non-citrus hosts by dodder (*Cuscuta subinclusa* Dur. & Hilg.). *Plant Dis Repr*. 53:947-948.
- Derrick, K. S., Brlansky, R. H., Lee, R. F., Timmer, L. W. & Nguyen, T. K. (1988). Two components associated with the citrus ringspot virus. En: Proc. 10 th Conf. IOCV. IOCV, Riverside, CA, USA. p 340-342
- Dixon, A. F. G. *Aphid Ecology An Optimization Approach*. Dordrecht: Springer Netherlands, 1985. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-5868-8>.
- Djelouah K, Potere O, Boscia D, D'Onghia AM. 2000. Production of monoclonal antibodies to Citrus psorosis virus. In: da Graca LV, Lee RF, Yokomi RK, editors. Proceedings of the 14th Conference of P Moreno et al. /

- Journal of Citrus Pathology iocv\_journalcitruspathology\_28860 14/18 the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 152-158.
- D'Onghia, A. M., F. Carimi, F. De Pasquale, K. Djelouah, and G. P. Martelli. "Elimination of *Citrus Psorosis Virus* by Somatic Embryogenesis from Stigma and Style Cultures: Elimination of CPsV from Citrus by Somatic Embryogenesis." *Plant Pathology* 50, no. 2 (April 2001): 266–69.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2001.00550.x>.
- D'Onghia, A M, K Djelouah, D Alioto, M A Castellano, and V Savino. "ELISA CORRELATES WITH BIOLOGICAL INDEXING FOR THE DETECTION OF CITRUS PSOROSIS-ASSOCIATED VIRUS." *Journal of Plant Pathology*, 1998.
- D'Onghia, A M, K Djelouah, and V Savino. "SEROLOGICAL DETECTION OF CITRUS PSOROSIS VIRUS IN SEEDS BUT NOT IN SEEDLINGS OF INFECTED MANDARIN AND SOUR ORANGE," 2000, 3.
- Dorokhov, Yuri L., Ekaterina V. Sheshukova, Tatiana E. Byalik, and Tatiana V. Komarova. "Diversity of Plant Virus Movement Proteins: What Do They Have in Common?" *Processes* 8, no. 12 (November 26, 2020): 1547.  
<https://doi.org/10.3390/pr8121547>.
- Dorst, H. J. M. "Evidence for a Soilborne Nature of Freesia Leaf Necrosis." *Netherlands Journal of Plant Pathology* 81, no. 1–2 (January 1975): 45–48. <https://doi.org/10.1007/BF02650328>.
- Duran-Vila, N., & Moreno, P. (2000). Enfermedades de los cítricos. Ediciones Mundi-Prensa Madrid, España, p 165
- Eastop, V.F. (1983) The biology of the principle virus vectors. In *PlantVirus Epidemiology:theSpreadandControl ofInsect-BorneViruses* (Plumb, R.T. and Thresh, J.M., eds). Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 115–132.
- Fawcett, H. S., and L. J. Klotz. "Types and Symptoms Of Psorosis and Psorosis-like Diseases of Citrus" 32 (1938): 22.
- Fawcett, H. S., & Cochran, L. C. (1942). Symptom expression of psorosis as related to kind of inoculum. *Phytopathology*, 32, 22
- Fawcett, H. S. (1932). New angles on treatment of bark diseases of citrus. *Calif. Citograph*, 17, 406–408
- Fereres, Alberto, and Aranzazu Moreno. "Behavioural Aspects Influencing Plant Virus Transmission by Homopteran Insects." *Virus Research* 141, no. 2 (May 2009): 158–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.10.020>.
- Ferreira, Lucrecia. "Generación de Construcciones Genéticas Basadas En RNAi o CRISPR-Cas9 Para El Control de La Enfermedad Emergente de Los Cítricos Huanglongbing." UNLP, 2020.
- Fry, P.R., 1958. The relationship of *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. to the big-vein disease of lettuce. *N. Z. J. Agric. Res.* 1, 301-304.
- Mendoza, A. Hermoso de, J. F. Ballester-Olmos, and J. A. Pina. "Transmission of Citrus Tristeza Virus by Aphids (Homoptera, Aphididae) in Spain." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 9, no. 9 (1984). <https://doi.org/10.5070/C55ZJ9877D>.
- Gaafar, Yahya Z. A.; Ziebell, Heiko (2020). Aphid transmission of nanoviruses. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, e21668–. doi:10.1002/arch.21668
- Gadhve, Kiran R., Saurabh Gautam, David A. Rasmussen, and Rajagopalbabu Srinivasan. "Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus." *Viruses* 12, no. 7 (July 17, 2020): 773.  
<https://doi.org/10.3390/v12070773>.

- García, M. L., E. Dal Bo, O. Grau, and R. G. Milne. "The Closely Related Citrus Ringspot and Citrus Psorosis Viruses Have Particles of Novel Filamentous Morphology." *Journal of General Virology* 75, no. 12 (December 1, 1994): 3585–90. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3585>.
- García, María Laura, Elena Dal Bó, John V. da Graça, Selma Gago-Zachert, John Hammond, Pedro Moreno, Tomohide Natsuaki, et al. "ICTV Virus Taxonomy Profile: Ophioviridae." *Journal of General Virology* 98, no. 6 (June 1, 2017): 1161–62. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000836>.
- García, María Laura, Elena Dal Bó, Vicente Pallás, Jose A Navarro, Carina A Reyes, Gabriel Robles Luna, Takahide Sasaya, Ioannis E Tzanetakis, Anna María Vaira, and Martin Verbeek. "Virus Taxonomy The ICTV Report on Virus Classification and Taxon Nomenclature Aspiviridae Chapter," 2020.
- García ML, Arrese EL, Grau O, Sarachu AN. 1991a. Citrus psorosis disease agent behaves as a two components ssRNA virus. In: Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, editors. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 337- 344.
- García ML, Costa NB, Casafús CM, Sarachu AN. 1991b. Evaluation of different citrus as psorosis disease indicators and as psorosis virus propagation hosts. In: Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, editors. Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 380-385.
- García ML, Dal Bo E, Grau O, Milne RG. 1994. The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol.* 75:3585-3590.
- García ML, Grau O, Sarachu AN. 1991c. Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Res Virol.* 142:303-311.
- García ML, Sánchez de la Torre ME, Costa N, Grau O. 1996. Detection of citrus ringspot virus and citrus psorosis-associated virus using PCR. In: da Graça JV, Moreno P, Yokomi RK, editors. Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 336- 338.
- García ML, Sánchez-de-la-Torre ME, Dal Bo E, Djelouah K, Rouag N, Luisoni E, Milne RG, Grau O, Sánchez de la Torre ME. 1997. Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DASELISA. *Plant Pathol.* 46:830-836.
- Garnsey, Sm, and Lw Timmer. "Mechanical Transmissibility of Citrus Ringspot Virus Isolates From Florida, Texas, and California." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 8, no. 8 (1980). <https://doi.org/10.5070/C51QH291XT>.
- Garnsey SM, Timmer LW. 1988. Local lesion isolate of citrus ringspot virus induces psorosis bark scaling. In: Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, editors. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 334-339.
- Gautam, Saurabh, Kiran R. Gadhave, James W. Buck, Bhabesh Dutta, Timothy Coolong, Scott Adkins, Alvin M. Simmons, and Rajagopalbabu Srinivasan. "Effects of Host Plants and Their Infection Status on Acquisition and Inoculation of A Plant Virus by Its Hemipteran Vector." *Pathogens* 12, no. 9 (September 1, 2023): 1119. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091119>.
- Girola, C.D., 1920. Cultivo del lino en la Republica Argentina. *Anales de la Sociedad Rural Argentina* 54, 145-149.
- Gottwald, T. R., Palle, S. R., Miao, H., Seyran, M., Skaria, M., & da Graca, J. V. (2005). Assessment of the possibility of natural spread of Citrus Psorosis disease. In: Hilf ME, Duran-Vila M, Rocha-Peña MA. (eds) Proc 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 3-6 November 2004. Riverside, CA, USA, IOCV, p 240- 250

- Gray, Stewart M. "Aphid Transmission of Plant Viruses: Plant Viruses." *Current Protocols in Microbiology* 10, no. 1 (August 2008). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16b01s10>.
- Grogan, R.G., Zink, F.W., Hewitt, W.B., Kimble, K.A., 1958. The association of *Olpidium* with the big-vein disease of lettuce. *Phytopathology* 48, 292-297.
- Guyot, A.L., 1927. Contribution a l' etude systematique et biologique de l'*Asterocystis radialis*. *Annales des Epiphyties* 8, 79-93.
- Haeske, E., 1950. Untersuchungen über das Blattnervenmosaik des Salats, Thesis Justus Liebig Universität. Gießen, p. 86.
- Halter MC, Hajimorad MR. "Evaluation of Seed Transmissibility of Soybean Vein Necrosis-Associated Virus in Two Soybean Cultivars Grown Under Field Conditions." *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 06, no. 06 (2015). <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000278>.
- Hand, Melanie L, and Anna M G Koltunow. "The Genetic Control of Apomixis: Asexual Seed Formation." *Genetics* 197, no. 2 (June 1, 2014): 441–50. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.163105>.
- Harper, S. J., N. Killiny, S. Tatineni, S. Gowda, S. J. Cowell, T. Shilts, and W. O. Dawson. "Sequence Variation in Two Genes Determines the Efficacy of Transmission of Citrus Tristeza Virus by the Brown Citrus Aphid." *Archives of Virology* 161, no. 12 (December 2016): 3555–59. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3070-x>.
- Harrison, B.D. "Studies on the Behavior of Potato Leaf Roll and Other Viruses in the Body of Their Aphid Vector *Myzus Persicae* (Sulz.)." *Virology* 6, no. 1 (August 1958): 265–77. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(58\)90074-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(58)90074-6).
- Hartwright, L.M., Hunter, P.J., Walsh, J.A., 2010. A comparison of *Olpidium* isolates from a range of host plants using internal transcribed spacer sequence analysis and host range studies. *Fungal Biology* 114, 26-33.
- Hermoso de Mendoza, A. "Los pulgones de los cítricos." *Levante Agrícola*, 1996, 39–45.
- Hernández-Rodríguez, Lester, Ana Bertalmio, Leticia Rubio, Rodolfo Rolón, Diego Maeso, and Fernando Rivas. "INABILITY OF THE BROWN APHID (TOXOPTERA CITRICIDA) TO TRANSMIT CITRUS PSOROSIS VIRUS UNDER CONTROLLED CONDITIONS," 2020. <https://doi.org/10.5070/C471045702>.
- Herrera-Vásquez, José Ángel, María Del Carmen Cebrián, Ana Alfaro-Fernández, María Del Carmen Córdoba-Sellés, and Concepción Jordá. "Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Detection and Differentiation of *Olpidium Bornovanus*, *O. Brassicae*, and *O. Virulentus*." *Mycological Research* 113, no. 5 (May 2009): 602–10. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.01.007>.
- Herrera-Vásquez, José Ángel, M. C. Cebrián, A. A. Fernández, M. C. Córdoba Sellés, and C. Jordá. "Identificación y Diferenciación Morfológica y Molecular de *Olpidium* Spp." 38 (2012): 371–86.
- Herron, C M, and T E Mirkov. "Citrus Tristeza Virus Transmission by the Toxoptera Citricida Vector: In Vitro Acquisition and Transmission and Infectivity Immunoneutralization Experiments." *Journal of Virological Methods*, 2006, 7.
- Hildebrand, A.A., 1934. Recent observations on strawberry root rot in the Niagara Peninsula. *Can. J. Res.* 11, 18-31.
- Hiruki, C. "Recovery and Identification of Tobacco Stunt Virus from Air-Dried Resting Spores of *Olpidium Brassicae*." *Plant Pathology* 36, no. 2 (June 1987): 224–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1987.tb02227.x>.
- Hiruki, C., 1964. Mechanical transmission of tobacco stunt virus. *Virology* 23, 288-290.
- Hiruki, C., 1965. Transmission of tobacco stunt virus by *Olpidium brassicae*. *Virology* 25, 541-549.

- Hui, Elizabeth, and D'Ann Rochon. "Evaluation of the Roles of Specific Regions of the *Cucumber Necrosis Virus* Coat Protein Arm in Particle Accumulation and Fungus Transmission." *Journal of Virology* 80, no. 12 (June 15, 2006): 5968–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.02485-05>.
- Hull, R. (2002) *Matthews' Plant Virology*, 4th edn. San Diego: Academic Press.
- Hung, T. H., M. L. Wu, and H. J. Su. "A Rapid and Sensitive Assay Based on the One-Step Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Technique Was Developed for the Detection of Citrus Tristeza Virus (CTV) in Citrus Plants" *Journal of Phytopathology* 148, no. 7–8 (August 2000): 469–75. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00539.x>.
- Ingwell, Laura L., Sanford D. Eigenbrode, and Nilsa A. Bosque-Pérez. "Plant Viruses Alter Insect Behavior to Enhance Their Spread." *Scientific Reports* 2, no. 1 (December 2012): 578. <https://doi.org/10.1038/srep00578>.
- Jacobsen, B., 1943. Studies on *Olipidium brassicae* (wor.) Dang. Meddelelser fra plantepatologisk afdeling kongelige veterinaer og landbohojskole 24, 1-53.
- Jayasinghe, W. H., Akhter, M. S., Nakahara, K., & Maruthi, M. N. (2021). Effect of aphid biology and morphology on plant virus transmission. *Pest Management Science*. doi:10.1002/ps.6629
- Jeger, M.J., Z. Chen, G. Powell, S. Hodge, and F. van den Bosch. "Interactions in a Host Plant-Virus-Vector-Parasitoid System: Modelling the Consequences for Virus Transmission and Disease Dynamics." *Virus Research* 159, no. 2 (August 2011): 183–93. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.04.027>.
- Jeong, M. I., Y. J. Choi, J. H. Joa, K. S. Choi, and B. N. Chung. "First Report of *Freesia Sneak Virus* in Commercial *Freesia Hybrida* Cultivars in Korea." *Plant Disease* 98, no. 1 (January 2014): 162–162. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0484-PDN>.
- Jiang, L.H., Hiruki, C., 1996. Polymerase chain reaction amplification and restriction analysis of the ribosomal DNA of *Olipidium radicale* isolates. *J. Microbiol. Meth.* 26, 87-93.
- Kachhwaha, Neetu. "Chapter 1: Plant Virus-Vector Relationships and Disease Transmission." In *Essentials of Economic Entomology*, 1:15, 2020.
- Kakani, Kishore, Ron Reade, and D'Ann Rochon. "Evidence That Vector Transmission of a Plant Virus Requires Conformational Change in Virus Particles." *Journal of Molecular Biology* 338, no. 3 (April 2004): 507–17. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.03.008>.
- Kakani, Kishore, Marjorie Robbins, and D'Ann Rochon. "Evidence That Binding of Cucumber Necrosis Virus to Vector Zoospores Involves Recognition of Oligosaccharides." *Journal of Virology* 77, no. 7 (April 2003): 3922–28. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.7.3922-3928.2003>.
- Kanyuka, Konstantin, Elaine Ward, and Michael J. Adams. "*Polymyxa Graminis* and the Cereal Viruses It Transmits: A Research Challenge." *Molecular Plant Pathology* 4, no. 5 (September 2003): 393–406. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00177.x>.
- Karling, J.S., 1937. Pascher and the genus *Asterocystis* of de Wildeman. *Mycologia* 29, 291-294.
- Kassanis, B., MacFarlane, I., 1965. Interaction of virus strain, fungus isolate, and host species in the transmission of tobacco necrosis virus. *Virology* 26, 603e612.
- Killiny, N., S. J. Harper, S. Alfaress, C. El Mohtar, and W. O. Dawson. "Minor Coat and Heat Shock Proteins Are Involved in the Binding of Citrus Tristeza Virus to the Foregut of Its Aphid Vector, *Toxoptera Citricida*." Edited by H. L. Drake. *Applied and Environmental Microbiology* 82, no. 21 (November 2016): 6294–6302. <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-16>.
- Koch, L.W., 1935. Recent investigations on tobacco root rot in Canada. *Can. J. Res.* 13c, 174-186.

- Koganezawa, Hiroki, H Inoue, and Takahide Sasaya. "Host Specificity and Multiplication of Eight Isolates of *Olpidium Brassicae* Sensu Lato and Its Related *Olpidium* Sp.," no. 4 (2005): 39–59.
- Kokane, Amol D., Sunil B. Kokane, Ashish J. Warghane, Mrugendra G. Gubyad, Ashwani Kumar Sharma, M. Krishna Reddy, and Dilip Kumar Ghosh. "A Rapid and Sensitive Reverse Transcription–Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for the Detection of Indian Citrus Ringspot Virus." *Plant Disease* 105, no. 5 (May 1, 2021): 1346–55. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE>.
- Komazaki, Shinkichi. "Effects of Contant Temperatures Con Population Growth of Three Aphid Species, *Toxoptera Citricidus* (Kirkaldy), *Aphis Citricola* van Der Goot and *Aphis Gossypii* Glover Homoptera Aphididae on Citrus." 1982, no. 17 (1982): 75–81.
- Kormelink, R, Garcia, M L, Goodin, M, Sasaya, T, Haenni, A L. (2011). Negative-strand RNA viruses: the plant-infecting counterparts. *Virus Res*,162(1-2),184-202
- Landis, J. R., and Koch, G. G. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174.
- Lange, Lene, and Violeta Insunza. "Root-Inhabiting *Olpidium* Species: The *O. Radicale* Complex." *Transactions of the British Mycological Society* 69, no. 3 (December 1977): 377–84. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(77\)80074-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(77)80074-0).
- Lange, Lene, and Lauritz W. Olson. "The Zoospore of *Olpidium Brassicae*." *Protoplasma* 90, no. 1–2 (March 1976): 33–45. <https://doi.org/10.1007/BF01276478>.
- Lay, Chih-Ying, Chantal Hamel, and Marc St-Arnaud. "Taxonomy and Pathogenicity of *Olpidium Brassicae* and Its Allied Species." *Fungal Biology* 122, no. 9 (September 2018): 837–46. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.04.012>.
- Lay, C.-Y., Bell, T.H., Hamel, C., Harker, N., Mohr, R., Greer, C.W., Yergeau, E., StArnaud, M., 2016. The microbial assemblages of canola roots in the Canadian prairie. 16th International Symposium on Microbial Ecology, August 21e26. Palais des Congr es, Montr eal, QC, Canada.
- Lee, Richard F., Manjunath L. Keremane, and Chandrika Ramadugu. "Use of Young Plants for Biological Indexing of Graft Transmissible Pathogens of Citrus." *Crop Protection* 143 (May 2021): 105524. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105524>.
- Leebens-Mack, J. H., M. S. Barker, E. J. Carpenter, M. K. Deyholos, M. A. Gitzendanner, S. W. Graham, and P. Szövényi. "One Thousand Plant Transcriptomes and the Phylogenomics of Green Plants." *Nature*, no. 574 (2019): 679–85. <https://doi.org/10.1038/s41586019-1693-2>.
- Legarreta, G.G, M.L García, N Costa, and O Grau. "A Highly Sensitive Heminested RT-PCR Assay for the Detection of Citrus Psorosis Virus Targeted to a Conserved Region of the Genome." *Journal of Virological Methods* 84, no. 1 (January 2000): 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00123-8](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00123-8).
- Legreve, Anne, Philippe Delfosse, Brigitte Vanpee, Andre Goffin, and Henri Maraite. "Differences in Temperature Requirements between *Polymyxa* Sp. of Indian Origin and *Polymyxa Graminis* and *Polymyxa Betae* from Temperate Areas," 1998, 11.
- Lin, M. T., R. N. Campbell, P. R. Smith, and J. H. M. Temmink. "Lettuce Big-Vein Virus Transmission by Single-Sporangium Isolates of *Olpidium Brassicae*." *Phytopathology* 60 (1970): 1630–34.
- Lin, L., Li, R., Bateman, M., Mock, R., & Kinard, G. (2013). Development of a multiplex TaqMan real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Asian prunus viruses, plum bark necrosis stem pitting associated virus, and peach latent mosaic viroid. *Eur J Plant Pathol*, 137, 797-804

- Lins, Elison Alfeu, João Pedro Mazuco Rodriguez, Sandy Ismael Scoloski, Juliana Pivato, Marília Balotin Lima, José Maurício Cunha Fernandes, Paulo Roberto Valle da Silva Pereira, Douglas Lau, and Rafael Rieder. "A Method for Counting and Classifying Aphids Using Computer Vision." *Computers and Electronics in Agriculture* 169 (February 2020): 105200. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.105200>.
- Liu, Jinxiang, Lingdi Li, Hengyan Zhao, Yan Zhou, Hongsu Wang, Zhongan Li, and Changyong Zhou. "Titer Variation of Citrus Tristeza Virus in Aphids at Different Acquisition Access Periods and Its Association with Transmission Efficiency." *Plant Disease* 103, no. 5 (May 2019): 874–79. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0811-RE>.
- Liu, Zhen, Zhenfei Dong, Binhui Zhan, and Shifang Li. "Characterization of an Isolate of Citrus Concave Gum-Associated Virus from Apples in China and Development of an RT-RPA Assay for the Rapid Detection of the Virus." *Plants* 10, no. 11 (October 20, 2021): 2239. <https://doi.org/10.3390/plants10112239>.
- Loconsole G, Castellano MA, Dell'Orco M, Boscia D, Savino V. 2006. Serological detection of Citrus psorosis virus using a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *J Plant Pathol.* 88:171-177.
- Loconsole G, Fatone MT, Savino V. 2009. Specific digoxigenin-labelled riboprobes for detection of Citrus psorosis virus and Citrus variegation virus by molecular hybridization. *J Plant Pathol.* 91:311-319.
- Loconsole G, Saponari M, Savino V. 2010. Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *Eur J Plant Pathol.* 128:251-259.
- Lot, Hervé, Robert N. Campbell, Sylvie Souche, Robert G. Milne, and Piero Roggero. "Transmission by *Olipidium Brassicae* of *Mirafiori Lettuce Virus* and *Lettuce Big-Vein Virus*, and Their Roles in Lettuce Big-Vein Etiology." *Phytopathology*® 92, no. 3 (March 2002): 288–93. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.3.288>.
- Maccarone, L. D. "Relationships Between the Pathogen *Olipidium Virulentus* and Viruses Associated with Lettuce Big-Vein Disease." *Plant Disease* 97, no. 6 (June 2013): 700–707. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0979-FE>.
- Maccarone, L. D., M. J. Barbetti, K. Sivasithamparam, and R. A. C. Jones. "Molecular Genetic Characterization of *Olipidium Virulentus* Isolates Associated with Big-Vein Diseased Lettuce Plants." *Plant Disease* 94, no. 5 (May 2010): 563–69. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0563>.
- Maeso, D.; Bertalmío, A., Tanaka, H.; Sakuma, T. 2000. Estudio sobre ocurrencia y transmisión de psorosis. In: Resultado de Investigación Proyecto INIA – JICA Protección de Árboles Frutales 1995/2000. pp 43 – 48. Publicación interna, INIA Uruguay (Eds).
- Manu, Matthew. "Natural Transmission of Grapevine Vein Clearing Virus," 2023.
- Marchal, E., 1901. Recherches biologiques sur une Chytridin ee parasite du Lin. *Rev. Mycol.* 23, 113-117.
- Margaritopoulos, J.T., M. Tzortzi, K.D. Zarpas, J.A. Tsitsipis, and R.L. Blackman. "Morphological Discrimination of *Aphis Gossypii* (Hemiptera: Aphididae) Populations Feeding on Compositae." *Bulletin of Entomological Research* 96, no. 2 (April 2006): 153–65. <https://doi.org/10.1079/BER2005410>.
- Martín S, Alioto D, Milne RG, Guerri J, Moreno P. 2002a. Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. *Plant Pathol.* 51:134-141.
- Martín S, García ML, Troisi A, Rubio L, Legarreta G, Grau O, Alioto D, Moreno P, Guerri J. 2006. Genetic variation of populations of Citrus psorosis virus. *J Gen Virol.* 87:3097-3102.
- Martín S, López C, García ML, Naum-Onganía G, Grau O, Flores R, Moreno P, Guerri J. 2005. The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Citrus psorosis virus: comparative analysis with other ophioviruses. *Arch Virol.* 150:167-176.

- Martín S, Milne RG, Alioto D, Guerri J, Moreno P. 2002b. Psorosis-like symptoms induced by causes other than Citrus psorosis virus. In: Duran-Vila N, Milne RG, da Graça JV, editors. Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 197-204
- Mauck, Kerry, Nilsa A. Bosque-Pérez, Sanford D. Eigenbrode, Consuelo M. De Moraes, and Mark C. Mescher. "Transmission Mechanisms Shape Pathogen Effects on Host-Vector Interactions: Evidence from Plant Viruses." Edited by Charles Fox. *Functional Ecology* 26, no. 5 (October 2012): 1162–75. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02026.x>.
- Mauck, Kerry E., Quentin Chesnais, and Lori R. Shapiro. "Evolutionary Determinants of Host and Vector Manipulation by Plant Viruses." In *Advances in Virus Research*, 101:189–250. Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2018.02.007>.
- Miles, P. W. (1987) Feeding process of Aphidoidea in relation to effects on their food plants. In A. K. Minks and P. Harrewijn (eds), *Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 2A, pp. 321-339. Amsterdam: Elsevier.
- Milne, R. G. "Role of Electron Microscopy in Discovering and Characterizing Plant Viruses: A Few Examples." In *Beitrage Zur Zuchtungsforschung*, 35–40, 2000.
- Mochizuki, Tomofumi, Ayami Hojo-Kanda, Takehiro Ohki, Masato Kawabe, and Shinya Tsuda. "Comparisons of Ribosomal DNA-Internal Transcribed Spacer Sequences and Biological Features among *Olpidium Bornovanus* Isolates from Cucurbitaceae-Cultivating Soil in Japan." *Journal of General Plant Pathology* 78, no. 1 (January 2012): 49–53. <https://doi.org/10.1007/s10327-011-0349-3>.
- Momonoi, K., M. Mori, K. Matsuura, J. Moriwaki, and T. Morikawa. "Quantification of *Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus* and Its Vector, *Olpidium Virulentus*, from Soil Using Real-Time PCR." *Plant Pathology* 64, no. 4 (August 2015): 825–30. <https://doi.org/10.1111/ppa.12333>.
- Money, Nicholas P. "Fungal Cell Biology and Development." In *The Fungi*, 37–66. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00002-5>.
- . "Fungal Diversity." In *The Fungi*, 1–36. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00001-3>.
- . "Fungi and Biotechnology." In *The Fungi*, 401–24. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00012-8>.
- . "Spore Production, Discharge, and Dispersal." In *The Fungi*, 67–97. Elsevier, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00003-7>.
- Moore, G. A. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends Genet*, 17(9), 536-540, 2001
- Morales, Francisco J, Elaine Ward, Mauricio Castano, Jose A Arroyave, Ivan Lozano, and Michael J Adams. "Emergence and Partial Characterization of Rice Stripe Necrosis Virus and Its Fungus Vector in South America," 1999.
- Moreno, P., & Roistacher, C. N. (1990). Las enfermedades de los citrus transmisibles por injerto: una puesta al día. *Tristeza*. *Phytoma* 20, 29-37
- Moreno, Pedro, Silvia Ambrós, María R. Albiach-Martí, José Guerri, and Leandro Peña. "Citrus Tristeza Virus: A Pathogen That Changed the Course of the Citrus Industry." *Molecular Plant Pathology* 9, no. 2 (March 2008): 251–68. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>.
- Moreno, Pedro, José Guerri, and María Laura García. "The Psorosis Disease of Citrus: A Pale Light at the End of the Tunnel." *Journal of Citrus Pathology* 2, no. 1 (May 14, 2015). <https://doi.org/10.5070/C421028860>.



- Moreno P. 2000a. Yellow ringspot. In: Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH, editors. Compendium of citrus diseases. St Paul (MN): APS Press. p. 65.
- Moreno P. 2000b. Mosaico amarillo (Citrus yellow mosaic). In: Duran-Vila N, Moreno P, editors. Enfermedades de los cítricos. Madrid (Spain): MundiPrensa. p. 74-75.
- Morikawa, T, Y Chikuo, and T Natsuaki. "Transmission of Tulip Mild Mottle Mosaic by *Olpidium Brassicae*." *Jpn J Phytopathol*, no. 63 (1997): 504.
- Morikawa, T., Y. Taga, and T. Morii. "RESISTANCE OF TULIP CULTIVARS TO MILD MOTTLE MOSAIC DISEASE." *Acta Horticulturae*, no. 673 (May 2005): 549–53.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.673.74>.
- Nault, L.R. (1997) Arthropod transmission of plant viruses—a new synthesis. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 90, 521–541.
- Naum-Onganía, Gabriela, Selma Gago-Zachert, Eduardo Peña, Oscar Grau, and Maria Laura Garcia. "Citrus Psorosis Virus RNA 1 Is of Negative Polarity and Potentially Encodes in Its Complementary Strand a 24K Protein of Unknown Function and 280K Putative RNA Dependent RNA Polymerase." *Virus Research* 96, no. 1–2 (October 2003): 49–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00172-2).
- Navarro, L., Pina, J. A., Juárez. J., Ballester-Olmos, J. F., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Zaragoza, S., & Medina, A. (2002). The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2001. In "Proc. 15th Conf. International Organization of Citrus Virologists". IOCV, Riverside, CA, USA
- Navarro, L. (1993). Citrus sanitation, quarantine and certification programs. In: Moreno, P., da Graça, J. V., Timmer, L. W. (eds.). Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA, USA, p 383-391
- Navarro, L. (2012). The spanish Citrus Industry. Proc XII International Citrus Congress, Valencia, España, Plenary Conference, 1
- Navarro, Beatriz, Maria Minutolo, Angelo De Stradis, Francesco Palmisano, Daniela Alioto, and Francesco Di Serio. "The First Phlebo-like Virus Infecting Plants: A Case Study on the Adaptation of Negative-stranded RNA Viruses to New Hosts." *Molecular Plant Pathology* 19, no. 5 (2018a): 1075–89.  
<https://doi.org/10.1111/mpp.12587>.
- Navarro B, Zicca S, Minutolo M, Saponari M, Alioto D, Di Serio F. A Negative-Stranded RNA Virus Infecting Citrus Trees: The Second Member of a New Genus Within the Order Bunyavirales. *Front Microbiol.* 2018b Oct 2;9:2340. doi: 10.3389/fmicb.2018.02340. PMID: 30333811; PMCID: PMC6176071.
- Navarro, Jose A., Jesus A. Sanchez-Navarro, and Vicente Pallas. "Key Checkpoints in the Movement of Plant Viruses through the Host." In *Advances in Virus Research*, 104:1–64. Elsevier, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2019.05.001>.
- Navas-Castillo J, Moreno P. 1993a. Citrus ringspot diseases in Spain. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, editors. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 163- 172.
- Navas-Castillo J, Moreno P. 1993b. Biological diversity of citrus ringspot isolates in Spain. *Plant Pathol.* 42:347-357.
- Navas-Castillo J, Moreno P. 1995. Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with citrus psorosis and ringspot diseases. *Eur J Plant Pathol.* 101:343-348.
- Navas-Castillo J, Moreno P, Ballester-Olmos JF, Pina JA, Hermoso de Mendoza A. 1991. Detection of a necrotic strain of citrus ringspot in Star Ruby grapefruit in Spain. In: Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, editors.

- Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of P Moreno et al. / Journal of Citrus Pathology iocv\_journalcitruspathology\_28860 16/18 Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 345- 351.
- Navas-Castillo J, Moreno P, Cambra M, Derrick KS. 1993. Partial purification of a virus associated with a Spanish isolate of citrus ringspot. *Plant Pathol.* 42:339-346.
- Navas-Castillo J, Moreno P, Duran-Vila N. 1995. Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens are maintained in callus culture. *Plant Cell Tiss Org.* 40:133-137.
- Nelson, D. L., and M. M. Cox. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 7th ed. W. H. Freeman, 2017.
- Ng, James C. K., and Keith L. Perry. "Transmission of Plant Viruses by Aphid Vectors." *Molecular Plant Pathology* 5, no. 5 (September 2004): 505–11. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2004.00240.x>.
- Ng, James CK; Zhou, Jaclyn S (2015). Insect vector–plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges. *Current Opinion in Virology*, 15, 48–55. doi:10.1016/j.coviro.2015.07.006
- Nour-Eldin, Farid, and M. T. El-Banna. "Distribution and Movement of Psorosis and Tristeza Viruses in Citrus Plants." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 3, no. 3 (1965). <https://doi.org/10.5070/C579122505>.
- Osman F, Hodzic E, Sun-Jung K, Jinbo W, Vidalakis G. 2015. Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of Citrus tristeza virus, Citrus psorosis virus, and Citrus leaf blotch virus. *J Virol Methods.* 220:64-75.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A. and Fereres, A. (2002) Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J. Gen. Virol.* 83, 3163–3171.
- Palle, S. R., H. Miao, M. Seyran, E. S. Louzada, J. V. Da Graça, and M. Skaria. "Evidence for Association of Citrus Psorosis Virus with Symptomatic Trees and an Olpidium -like Fungus in Texas." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 16, no. 16 (2005). <https://doi.org/10.5070/C53MC2B02S>.
- Pascher, A., 1917. Asterocystis de Wildeman und Asterocystis Gobi. Beihefte zum Botanischen Centralblatt 35, 578-579.
- Peng, Jun, Yuanfeng Zhan, Fanyun Zeng, Haibo Long, Yuelin Pei, and Jianrong Guo. "Development of a Real-Time Fluorescence Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Quantitative Detection of *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Niveum* in Soil." *FEMS Microbiology Letters* 349, no. 2 (December 2013): 127–34. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12305>.
- Peters, L., Schwarz, M., 1912. Krankheiten und Beschädigungen des Tabaks. Mitteilungen aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft 13, 9-10.
- Pirone, T.P. and Perry, K.L. (2002) Aphids-nonpersistent transmission. *Adv. Bot. Res.* 36, 1–19.
- Plata, M. I., and C. M. Anderson. "Spread of Citrus Tristeza Virus in an Endemic Area in Argentina." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 15, no. 15 (2002). <https://doi.org/10.5070/C57MB0Z05G>.
- Pollard, D. G. (1973) Plant penetration by feeding aphids (Hemiptera, Aphidoidea): a review. *Bulletin of Entomological Research*, 62, 631-714.
- Porter, Katie, and Brad Day. "From Filaments to Function: The Role of the Plant Actin Cytoskeleton in Pathogen Perception, Signaling and Immunity." *Journal of Integrative Plant Biology* 58, no. 4 (April 2016): 299–311. <https://doi.org/10.1111/jipb.12445>.

- Price, W. C. "Transmission of Psorosis Virus by Dodder." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 3, no. 3 (1965). <https://doi.org/10.5070/C51732P07K>.
- Pujol, Arnoldo R., and Horacio N. Benatena. "Study of Psorosis in Concordia, Argentina." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 3, no. 3 (1965). <https://doi.org/10.5070/C57QK080RZ>.
- Pujol AR. 1966. Transmisión de psorosis a través de la semilla de citrange Troyer. Centro Reg Entrerr, Est Exp Concordia. Ser Técn. 10:3-7.
- Rao, Muhammad Junaid, Fang Ding, Nian Wang, Xiuxin Deng, and Qiang Xu. "Metabolic Mechanisms of Host Species Against Citrus Huanglongbing (Greening Disease)." *Critical Reviews in Plant Sciences* 37, no. 6 (November 2, 2018): 496–511. <https://doi.org/10.1080/07352689.2018.1544843>.
- Rivarez, M. P. S., Z. Kogej, N. Jakoš, A. Pecman, G. Seljak, A. Vučurović, M. Ravnikar, N. Mehle, and D. Kutnjak. "First Report of Ranunculus White Mottle Ophiovirus in Slovenia in Pepper with Yellow Leaf Curling Symptom and in Tomato." *Plant Disease* 106, no. 7 (July 1, 2022): 2003. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-21-1624-PDN>.
- Reyes CA, Peña EJ, Zane MC, Sánchez DV, Grau O, García ML. 2009. Differential resistance to Citrus psorosis virus in transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing hairpin RNA derived from the coat protein and 54K protein genes. *Plant Cell Rep.* 28:1817-1825.
- Robles Luna, Gabriel, Eduardo José Peña, María Belén Borniego, Manfred Heinlein, and María Laura García. "Citrus Psorosis Virus Movement Protein Contains an Aspartic Protease Required for Autocleavage and the Formation of Tubule-Like Structures at Plasmodesmata." Edited by Anne E. Simon. *Journal of Virology* 92, no. 21 (November 2018): e00355-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00355-18>.
- Robles Luna, Gabriel, Eduardo José Peña, María Belén Borniego, Manfred Heinlein, and Maria Laura Garcia. "Ophioviruses CPsV and MiLBVV Movement Protein Is Encoded in RNA 2 and Interacts with the Coat Protein." *Virology* 441, no. 2 (July 2013): 152–61. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.03.019>.
- Robles Luna, Gabriel, Carina A. Reyes, Eduardo J. Peña, Eliana Ocolotobiche, Cecilia Baeza, Maria Belén Borniego, Richard Kormelink, and María Laura García. "Identification and Characterization of Two RNA Silencing Suppressors Encoded by Ophioviruses." *Virus Research* 235 (May 2017): 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.013>.
- Rochon, D'Ann, Kishore Kakani, Marjorie Robbins, and Ron Reade. "MOLECULAR ASPECTS OF PLANT VIRUS TRANSMISSION BY OLPIDIUM AND PLASMODIOPHORID VECTORS." *Annual Review of Phytopathology* 42, no. 1 (September 1, 2004): 211–41. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140317>.
- Rodelo-Urrego, M., I. Pagán, P. González-Jara, M. Betancourt, A. Moreno-Letelier, M. A. Ayllón, A. Fraile, D. Piñero, and F. García-Arenal. "Landscape Heterogeneity Shapes Host-Parasite Interactions and Results in Apparent Plant-Virus Codivergence." *Molecular Ecology* 22, no. 8 (April 2013): 2325–40. <https://doi.org/10.1111/mec.12232>.
- Roistacher, C. N. (1991). Psorosis complex: psorosis-A, psorosis-B and ringspot. In: International Organization of Citrus Virologists. (ed) Graft-Transmissible Diseases of Citrus, Handbook for Detection and Diagnosis. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations, p 115-126
- Roistacher, C. N. "Transmission of Tristeza and Seedling Yellows Tristeza Virus by Small Populations of *Aphis Gossypii*." *Plant Disease* 68, no. 1 (1984): 494. <https://doi.org/10.1094/PD-68-494>.
- Roistacher, C N, and M Bar-Joseph. "Aphid Transmission of Citrus Tristeza Virus: A Review," 1987, 5.

- Roistacher CN. 1980. Psorosis A. In: Bové JM, Vogel R, editors. Virus and virus-like diseases of citrus: A collection of colour slides. Paris (France): SETCOIRFA.
- Roistacher CN. 1993. Psorosis - A review. In: Moreno P, da Graça JV, Timmer LW, editors. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 139- 151.
- Roistacher CN, Blue RL. 1968. A psorosis-like virus causing symptoms only on Dweet tangor. In: Childs JFL, editor. Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Gainesville (FL): University of Florida Press. p. 13- 18
- Roistacher CN, Calavan EC. 1972. Heat tolerance of preconditioned citrus budwood for virus inactivation. P Moreno et al. / Journal of Citrus Pathology *iocv\_journalcitruspathology\_28860* 17/18 In: Price WC, editor. Proceedings of the 5th Conference of the International organization of Citrus Virologists. Gainesville (FL): University of Florida Press. p. 256-261.
- Roistacher CN, Calavan EC. 1974. Inactivation of five citrus viruses in plants held at warm glasshouse temperatures. *Plant Dis Repr.* 58:850-853.
- Rosa C, Polek M, Falk BW, Rowhani A. 2007. Improved efficiency for quantitative and qualitative indexing for Citrus tristeza virus and Citrus psorosis virus. *Plant Dis* 91:1089-1095.
- Saccardo, P.A., Berlese, A.N., de Toni, J.B., Fischer, E.D., 1888. *Sylloge Fungorum: omnium hucusque cognitorum: gasteromyceteeae, Phycomyceteeae, Myxomyceteeae, Ustilagineae, et Uredineae*, vol. 7. J. W. Edwards, Ann Arbor, Michigan, USA.
- Sackett, D. L, R. B. Haynes, Guyatt G. H., and P. Tugwell. *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*. 2nd ed. Boston: Little Brown, 1991.
- Sahtiyanci, S., 1962. Studien über einige wurzelparasitäre Olpidiaceen. *Archiv für Mikrobiologie* 41, 187-228.
- Sambade A, Martin S, Olmos A, García ML, Cambra M, Grau O, Guerri J, Moreno P. 2000. A fast one-step reverse transcription and polymerase chain reaction (RT- PCR) amplification procedure providing highly specific complementary DNA from plant virus RNA. *J Virol Methods*. 87:25-28.
- Sampson, K., 1939. *Olpidium brassicae* (wor.) Dang. And its connection with *Asterocystis radialis* de wildeman. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 23, 199-204.
- Sánchez de la Torre ME, Riva O, Zandomeni R, Grau O, García, ML. 1998. The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Mol Plant Pathol On-line* <http://194.247.68.33/mppol/1998/1019sanchez/>
- Sánchez-Damas, E. Avitia-García, A.M. Castillo-González, A. Villegas-Monter, and T. Corona-Torres. "ESTUDIO ANATÓMICO DE LA POLIEMBRIONÍA EN TRES PORTAINJERTOS DE CÍTRICOS." *Revista Chapingo Serie Horticultura* XII, no. 2 (December 2006): 145–52. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2005.10.045>.
- Saponari, M., Loconsole, G., Liao, H. H., Jiang, B., Savino, V., & Yokomi, R. K. (2013). Validation of high-throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *J Virol Methods*, 193(2), 478-486
- Sarachu AN, Arrese EL, Casafús C, Costa NB, García ML, Grau O, Marcó GM, Robles A. 1988. Biological assay and preliminary isolation of citrus psorosis disease agent from Argentina. In: Timmer LW, Garnsey SM, Navarro L, editors. Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Riverside (CA): IOCV. p. 343- 347.
- Sasaya, Takahide, and Hiroki Koganezawa. "Molecular Analysis and Virus Transmission Tests Place *Olpidium virulentus*, a Vector of Mirafiori Lettuce Big-Vein Virus and Tobacco Stunt Virus, as a Distinct Species Rather

- than a Strain of *Olpidium Brassicae*." *Journal of General Plant Pathology* 72, no. 1 (February 6, 2006): 20–25. <https://doi.org/10.1007/s10327-005-0239-7>.
- Sastry, K. Subramanya. *Seed-Borne Plant Virus Diseases*. India: Springer India, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-0813-6>.
- Sastry, K. Subramanya, Bikash Mandal, John Hammond, S. W. Scott, and R. W. Briddon. *Encyclopedia of Plant Viruses and Viroids*. New Delhi: Springer India, 2019. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3912-3>.
- Sekimoto, Satoshi, D'Ann Rochon, Jennifer E Long, Jaclyn M Dee, and Mary L Berbee. "A Multigene Phylogeny of *Olpidium* and Its Implications for Early Fungal Evolution." *BMC Evolutionary Biology* 11, no. 1 (2011): 331. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-331>.
- Shands, A. C., S. G. Crandall, and T. D. Miles. "First Report of the Ability of *Olpidium Virulentus* to Vector Blueberry Mosaic Associated Virus (BIMaV) on Southern Highbush Blueberry in California." First Report, 2017.
- Shang, Feng, Dan-Dan Wei, Xuan-Zhao Jiang, Dong Wei, Guang-Mao Shen, Ying-Cai Feng, Ting Li, and Jin-Jun Wang. "Reference Gene Validation for Quantitative PCR Under Various Biotic and Abiotic Stress Conditions in *Toxoptera Citricida* (Hemiptera, Aphidiae)." *Journal of Economic Entomology* 108, no. 4 (August 2015): 2040–47. <https://doi.org/10.1093/jee/tov184>.
- Shilts, Turksen, Chooa El-Mohtar, William O. Dawson, and Nabil Killiny. "Citrus Tristeza Virus P33 Protein Is Required for Efficient Transmission by the Aphid *Aphis (Toxoptera) Citricidus* (Kirkaldy)." *Viruses* 12, no. 10 (October 6, 2020): 1131. <https://doi.org/10.3390/v12101131>.
- Shimomoto, Yoshifumi, Chika Takemura, Hironobu Yanagisawa, Yutaro Neriya, and Takahide Sasaya. "Complete Genome Sequence of a Novel Ophiovirus Associated with Chlorotic Disease of Pepper (*Capsicum Annum* L.) in Japan." *Archives of Virology* 168, no. 2 (February 2023): 48. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05691-5>.
- Shorthouse, J. D. *INSECTS AND OTHER ANIMALS*. Elsevier Ltd, 2003.
- Simeone, Melina, Claudio Gómez, Ana Bertalmío, Esperanza Ruiz, Claudia Hauteville, Laura Godoy Suarez, Blas Tito, and Maria L. García. "Detection of Citrus Psorosis Virus by RT-qPCR Validated by Diagnostic Parameters." *Plant Pathology* 70, no. 4 (May 2021): 980–86. <https://doi.org/10.1111/ppa.13341>.
- Smith, Alexander, Camilo Beltran-Acosta, and Alba Cotes. *Avances en el estudio del virus de la macana en el cultivo de fique (Furcraea spp.)*. 1st ed. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria - Corpoica, 2013. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-139-4>.
- Stafford, Candice A., Gregory P. Walker, and Diane E. Ullman. "Infection with a Plant Virus Modifies Vector Feeding Behavior." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, no. 23 (June 7, 2011): 9350–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100773108>.
- Stern, D L. "Aphids." *Current Biology* 18, no. 12 (2006): 504–5.
- Stevens, M., & Lacomme, C. (2017). Transmission of plant viruses. In H. F. van Emden & R. Harrington (Eds.), *Aphids as crop pests* (pp. 323–361). Wallingford, UK: CABI.
- Stoltz, L. P., & Strang, J. (2005). Reproducing Fruit Trees by Graftage: Budding and Grafting. Cooperative Extension Service, University of Kentucky, College of Agriculture, 39, 1-7
- Subrahmanyam, P., and D. McDonald. "Occurrence of *Olpidium Brassicae* on Groundnut." *Transactions of the British Mycological Society* 75, no. 3 (January 1980): 506–9. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(80\)80137-9](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(80)80137-9).

- Swingle, Walter, and Herbert Webber. "The Principal Diseases of Citrous Fruits in Florida." U.S. Department of Agriculture, National Agricultural Library, 1896. <https://archive.org/details/principaldisease08swin>.
- Tamada, T., and B. D. Harrison. "Quantitative Studies on the Uptake and Retention of Potato Leafroll Virus by Aphids in Laboratory and Field Conditions." *Annals of Applied Biology* 98, no. 2 (July 1981): 261–76. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1981.tb00759.x>.
- Tanner, J. D., M. Kunta, J. V. da Graca, M. Skaria, and S. D. Nelson. "Evidence of a Low Rate of Seed Transmission of Citrus Tatter Leaf Virus in Citrus." *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* 18, no. 18 (2011). <https://doi.org/10.5070/C50B67Q81H>.
- Teakle, D.S., 1962. Transmission of tobacco necrosis virus by a fungus, *Olpidium brassicae*. *Virology* 18, 224-231.
- Teakle, D.S., Hiruki, C., 1964. Vector specificity in *Olpidium*. *Virology* 24, 539-544.
- Temmink, J.H.M., Campbell, R.N., 1968. The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. I. Formation of sporangia. *Can. J. Bot.* 46, 951-956.
- Temmink, J.H.M., Campbell, R.N., 1969a. The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. II. Zoospores. *Can. J. Bot.* 47, 227-231.
- Temmink, J.H.M., Campbell, R.N., 1969b. The ultrastructure of *Olpidium brassicae*. III. Infection of host roots. *Can. J. Bot.* 47, 421-424.
- Temmink, J.H.M., Campbell, R.N., Smith, P.R., 1970. Specificity and site of in vitro acquisition of tobacco necrosis virus by zoospores of *Olpidium brassicae*. *J. Gen. Virol.* 9, 201-213.
- Timmer, L. W. (2002). *Plagas Y Enfermedades de Los Cítricos*. Ediciones Mundi-Prensa
- Timmer LW. 1974. Necrotic strain of citrus ringspot virus and its relationship to citrus psorosis virus. *Phytopathology*. 64:389-394.
- Timmer LW, Beñatena HN. 1977. Comparison of psorosis and other viruses causing leaf flecking in citrus. *Proc Int Soc Citriculture*. 3:930-935.
- Timmer LW, Garnsey SM. 1980. Natural spread of citrus ringspot virus in Texas and its association with psorosis-like diseases in Florida and Texas. In: Calavan EC, Garnsey SM, Timmer LW, editors. *Proceedings of the 8th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside (CA): IOCV. p. 161-167.
- Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH. 2000. *Compendium of citrus diseases*. St Paul (MN): APS Press.
- Timmer LW, Garnsey SM, McRitchie JJ. 1978. Comparative symptomatology of Florida and Texas isolates of citrus ringspot virus on citrus and herbaceous hosts. *Plant Dis Repr*. 62:1054-1058.
- Tjallingii, W. F. (1978a) Electronic recording of penetration behaviour by aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24, 521-530.
- Tjallingii, W. F. (1978b) Mechanoreceptors of the aphid labium. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24, 531-537.
- Tkacz, A., Cheema, J., Chandra, G., Grant, A., Poole, P.S., 2015. Stability and succession of the rhizosphere microbiota depends upon plant type and soil composition. *ISME J.* 9, 2349-2359.
- Tomlinson, J. A., and B. J. Thomas. "Studies on Melon Necrotic Spot Virus Disease of Cucumber and on the Control of the Fungus Vector ( *Olpidium Radicale* )." *Annals of Applied Biology* 108, no. 1 (February 1986): 71–80. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1986.tb01967.x>.
- Tomlinson, J.A., Garrett, R.G., 1964. Studies on the lettuce big-vein virus and its vector *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. *Ann. Appl. Biol.* 54, 45-61.

- Torok VA, Vetten HJ. 2002. Characterisation of an ophiovirus associated with lettuce ring necrosis. In: Joint Conference of the International Working Groups on Legume and Vegetable Viruses, Bonn 4-9, August 2002. Abstract p. 4.
- UN Food and Agriculture Organization, Citrus fruit, fresh and processed: Statistical Bulletin, 2020. Rome
- Vaira, A.M., V. Lisa, A. Costantini, V. Masenga, S. Rapetti, and R.G. Milne. "OPHIOVIRUSES INFECTING ORNAMENTALS AND A PROBABLE NEW SPECIES ASSOCIATED WITH A SEVERE DISEASE IN FREESIA." *Acta Horticulturae*, no. 722 (October 2006): 191–200.  
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.722.24>.
- van der Meer, J.H.H., 1926. Rhizoctonia- en Olpidium-aantasting van bloemkoolplanten. Tijdschrift Over Plantenziekten 32, 209-234.
- Vanterpool, T.C., 1930. *Asterocystis radialis* in the roots of cereals in Saskatchewan. *Phytopathology* 20, 677-680.
- Varanda, Carla, Maria Do Rosário Félix, Cláudio M. Soares, Solange Oliveira, and Maria Ivone Clara. "Specific Amino Acids of Olive Mild Mosaic Virus Coat Protein Are Involved in Transmission by *Olpidium Brassicae*." *Journal of General Virology* 92, no. 9 (September 1, 2011): 2209–13. <https://doi.org/10.1099/vir.0.032284-0>.
- Vidal, E., R. K. Yokomi, A. Moreno, E. Bertolini, and M. Cambra. "Calculation of Diagnostic Parameters of Advanced Serological and Molecular Tissue-Print Methods for Detection of *Citrus Tristeza Virus*: A Model for Other Plant Pathogens." *Phytopathology*® 102, no. 1 (January 2012): 114–21.  
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-05-11-0139>.
- Velázquez, K., A. Renovell, M. Comellas, P. Serra, M. L. García, J. A. Pina, L. Navarro, P. Moreno, and J. Guerri. "Effect of Temperature on RNA Silencing of a Negative-stranded RNA Plant Virus: *Citrus Psorosis Virus*." *Plant Pathology* 59, no. 5 (October 2010): 982–90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2010.02315.x>.
- Wallace, J. M. "Virus-Strain Interference in Relation to Symptoms of Psorosis Disease of Citrus." *Hilgardia* 27, no. 8 (1957): 223–46.
- Wallace JM. 1945. Technique for hastening foliage symptoms of psorosis of citrus. *Phytopathology*. 35:535-542.
- Wallace JM. 1968. Recent developments in the citrus psorosis diseases. In: Childs JFL, editor. Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists. Gainesville (FL): University of Florida Press. p. 1-9.
- Wallace JM. 1978. Virus and virus-like diseases. In: Reuther W, Calavan EC, Carman GE, editors. The Citrus Industry. Berkeley (CA): University of California, Division of Agricultural Sciences. p. 67- 184. (vol. 4).
- Warghane, Ashish, Pragati Misra, Sumit Bhowmik, Kajal Kumar Biswas, Ashwani Kumar Sharma, M. Krishna Reddy, and Dilip Kumar Ghosh. "Development of a Simple and Rapid Reverse Transcription-Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for Sensitive Detection of Citrus Tristeza Virus." *Journal of Virological Methods* 250 (December 2017): 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.018>.
- Watkinson, Sarah C. "Molecular Ecology." In *The Fungi*, 189–203. Elsevier, 2016.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382034-1.00006-2>.
- Webster, John, and Roland Weber. *Introduction to Fungi*. 3rd ed. Cambridge University Press, 2007.
- Whiteside, J. O., Garnsey, S. M., Timmer, L. W., 1988. Compendium of Citrus Diseases. *American Phytopathological Society*, St. Paul, MN. 88pp.
- Whitfield, Anna E., Bryce W. Falk, and Dorith Rotenberg. "Insect Vector-Mediated Transmission of Plant Viruses." *Virology* 479–480 (May 2015): 278–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>.
- Woronin, M. S. "Plasmodiophora Brassicae." *Jahrbücher Für Wissenschaftliche Botanik* 11 (1878): 548–74.

- Yokomi, R K, and S M Garnsey. "Transmission of Citrus Tristeza Virus by Aphis Gossypii and Aphis Citricola in Florida," 2012, 4.
- Yoon, Ju-Yeon, Youn-Jung Choi, Gug-Seoun Choi, and Seung-Kook Choi. "First Report of Freesia Sneak Virus in Freesia Spp. in Korea." *Research in Plant Disease* 19, no. 4 (December 31, 2013): 313–18. <https://doi.org/10.5423/RPD.2013.19.4.313>.
- Zanek MC, Peña, E, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O, García ML. 2006. Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods*. 137:245-251.
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velázquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L, García ML. 2008. Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep*. 27:57-66.
- Zhou, Changyong, John V. Da Graça, Juliana Freitas-Astúa, Georgios Vidalakis, Nuria Duran-Vila, and Irene Lavagi. "Citrus Viruses and Viroids." In *The Genus Citrus*, 391–410. Elsevier, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00019-X>.
- Zhou, Y., H.M. Chen, X.F. Wang, Z.A. Li, M. Tang, and C.Y. Zhou. "LACK OF EVIDENCE FOR SEED TRANSMISSION OF CITRUS YELLOW VEIN CLEARING VIRUS DESPITE ITS FREQUENT DETECTION IN SEED TISSUES." *Journal of Plant Pathology* 1, no. 2 (2015). <https://doi.org/10.4454/JPP.V9713.023>.
- "Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin 2020." FAO. 2021. *Citrus Fruit Statistical Compendium*, 2020. Rome.
- "International Rules for Seed Testing: Detection of Squash Mosaic Virus, Cucumber Green Mottle Mosaic Virus and Melon Necrotic Spot Virus in Cucurbits." International Seed Testing Association (ISTA), 2014.
- "Complete Sequence of Three Phlebo-like Viruses Associated to Cristacortis, Concave Gum and Impietratura Diseases." In *Proceedings of the 2019 Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 2019.
- "Citrus Fruit Fresh and Processed Statistical Bulletin 2020." *Citrus Fruit Statistical Compendium*, 2020.
- One Thousand Plant Transcriptomes Initiative. "One Thousand Plant Transcriptomes and the Phylogenomics of Green Plants." *Nature* 574, no. 7780 (October 31, 2019): 679–85. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1693-2>.



# ANEXOS





## Abreviaturas

°C	Grados Celsius
CP	Proteína de la cápside
cDNA	ácido 2' desoxirribonucleico complementario
cm	centímetros
CPsV	citrus psorosis virus
DNA	ácido 2' desoxirribonucleico
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DPI	días post-inoculación
EDTA	etilen diamine tetra acetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
g	gramo(s)
h	hora(s)
HCl	Ácido clorihídrico
KCl	cloruro de potasio
kDa	kilodaltons
KOH	hidróxido de potasio
LR	Limón rugoso
M	molar
µg	microgramo(s)
µL	microlitro(s)
µM	micromolar
min	minuto

mL	mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensajero
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
NDP	Naranja Dulce Pineapple
ng	nanogramos
nt	nucleótidos
pb	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction
pH	Potencial Hidrógeno
%p/v	porcentaje peso en volumen
%v/v	porcentaje volumen en volumen
PsA	psoriasis tipo A
PsB	psoriasis tipo B
PVP	polivinilpirrolidona
qPCR	PCR cuantitativa
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa	ribonucleasa
RNAsin	ribonuclease inhibitor
RT	reverse transcription
RT-qPCR	PCR reversa cuantitativa
TAE	Tris-acetato-EDTA
TAS	Triple Antibody Sandwich
ubqt/UQ	ubiquitina
UV	ultravioleta

# Publicaciones

# Detection of citrus psorosis virus by RT-qPCR validated by diagnostic parameters

Melina Simeone<sup>1</sup>  | Claudio Gómez<sup>2</sup> | Ana Bertalmío<sup>3</sup>  | Esperanza Ruiz<sup>4</sup>  |  
Claudia Hauteville<sup>2</sup> | Laura Godoy Suarez<sup>2</sup> | Blas Tito<sup>2</sup> | María L. García<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata CONICET-UNLP Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

<sup>2</sup>Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Entre Ríos, Argentina

<sup>3</sup>Estación Experimental Salto Grande, Uruguay, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay

<sup>4</sup>Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Argentina

## Correspondence

María L. García, IBBM-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 49 y 115 s/n, La Plata, Argentina.

Email: garcia\_m@biol.unlp.edu.ar

## Funding information

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Grant/Award Number: ERIOS-630081, PD I081, RIST I091, PNFRU-1172 and 11721; Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Grant/Award Number: PICT 2014-1007 and PICT Start Up 3762; Universidad Nacional de La Plata, Grant/Award Number: X-692

## Abstract

Citrus psorosis virus (CPsV) is the causal agent of psorosis, an important disease of citrus. Sanitary and certification programmes helped reduce disease damage caused by psorosis and other graft-transmissible diseases in many citrus-growing regions. For quarantine and certification programmes, most of these diseases are currently diagnosed using biological indexing (BI) on sensitive indicator plants. In the case of citrus psorosis, CPsV can be detected by molecular methods such as quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR), which is cheaper and faster than BI, but sensitivity, reliability, and reproducibility of both procedures have not been compared so far. In this work, 128 plants from Argentina and Uruguay were analysed using BI and CPsV detection by the RT-qPCR assay. Almost perfect agreement between both diagnostic procedures and sensitivity, specificity, and estimated likelihood ratios indicate that RT-qPCR is equivalent to BI for citrus psorosis diagnosis, thus providing confidence in the quick diagnostic procedure to monitor the sanitary status of citrus trees.

## KEYWORDS

citrus psorosis virus, diagnostic parameters, RT-qPCR

## 1 | INTRODUCTION

Citrus is one of the most important fruit crops worldwide. Psorosis, the first graft-transmissible disorder discovered in citrus (Swingle & Webber, 1896), is a serious disease in many countries and has been endemic for years in north-east (NE) Argentina and in Uruguay (Danós, 1990; Diamante de Zubrzycki et al., 1984). Psorosis is described as a bark scaling disorder of citrus trees (Fawcett, 1933), affecting mainly the genus *Citrus*, with variable susceptibility of citrus relatives like *Poncirus trifoliata* and its hybrids with sweet orange, citranges, which are used as rootstocks (Moreno et al., 2015). Two

different psorosis syndromes have been described (Fawcett & Klotz, 1938): psorosis A (PsA), characterized by slow bark scaling of the trunk and main branches of adult trees, and psorosis B (PsB), a more aggressive type in which bark scaling occurs more rapidly and affects even young twigs. Old leaves often show chlorotic blotches and fruit may display depressed spots or rings in the rind, with discoloured tissue.

For years, several graft-transmissible diseases of citrus (concave gum-blind pocket, citrus variegation, citrus ringspot, impietratura, and cristacortis) were mistakenly associated with psorosis in the so called “psorosis group” (Roistacher, 1993;



Wallace & Drake, 1968) based on similar symptoms induced in young sweet orange indicator plants (Moreno et al., 2015). Later, citrus variegation was found to be caused by an ilarvirus (Pallas et al., 2013), citrus psorosis and citrus ringspot were identified as different isolates of citrus psorosis virus (CPsV; Derrick et al., 1988; García et al., 1991; Navas-Castillo & Moreno, 1993), and three different phlebo-like viruses were associated with concave gum (Navarro et al., 2018), cristacortis, and impietratura (Velázquez et al., 2019).

Graft-transmissible diseases of citrus cause crop losses estimated at 15%–25% (Moreno et al., 2015). These losses were reduced in Argentina and Uruguay following implementation of certification programmes (Danós, 1990; Moreno et al., 2015); however, psorosis still occurs in both the NE and north-west (NW) regions (Zanek et al., 2006). Because CPsV was unknown in the 1980s, the certification programme was based on biological indexing (BI) of the new citrus varieties before distribution to citrus growers. BI for psorosis is still required by certification programmes and is done by (a) graft-inoculating young sweet orange seedlings and monitoring for symptom appearance in an insect-proof temperature-controlled greenhouse; and (b) a cross-protection test by challenge-inoculation with a PsB isolate to confirm that the observed symptoms are indeed caused by psorosis (Roistacher, 1993). BI diagnosis requires special skills and facilities and the complete process takes about 1 year, which makes it very costly and not suitable for large-scale analyses. Therefore, a rapid, sensitive, and specific psorosis diagnostic method was urgently needed.

CPsV, the type member of genus *Ophiovirus*, family *Aspiviridae* (García et al., 2017), is the causal agent of citrus psorosis. Its genome has three single-stranded, negative-sense RNAs encapsidated by a coat protein (CP), which is the most abundant viral protein in infected tissues (García et al., 1991). Serological methods like double antibody sandwich (DAS)-ELISA (García et al., 1997), triple antibody sandwich (TAS)-ELISA (Alioto et al., 1999), and TAS-ELISA-horseradish peroxidase (HRP) (Zanek et al., 2006) using polyclonal and monoclonal antibodies obtained against the CP were developed for diagnosis. However, these antibodies are no longer available. At the same time a reverse transcription (RT) PCR protocol for CPsV detection was developed, but with low sensitivity (García et al., 1997). Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) is a powerful diagnostic method widely used to detect plant pathogens, including several citrus viruses (Loconsole et al., 2010; Osman et al., 2015). De Francesco et al. (2015) found that RT-qPCR using specific primers designed from the CP gene sequence conserved in all available isolates was much more sensitive than TAS-ELISA-HRP to detect CPsV.

Although several protocols for plant pathogen diagnosis have been developed, such as RT loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) for detection of Indian citrus ringspot virus and citrus tristeza virus (CTV; Kokane et al., 2020; Warghane et al., 2017), they have rarely been evaluated with respect to their reliability and reproducibility (Olmos et al., 2007; Sackett et al., 1991). Vidal et al. (2012) calculated the diagnostic parameters of several CTV detection

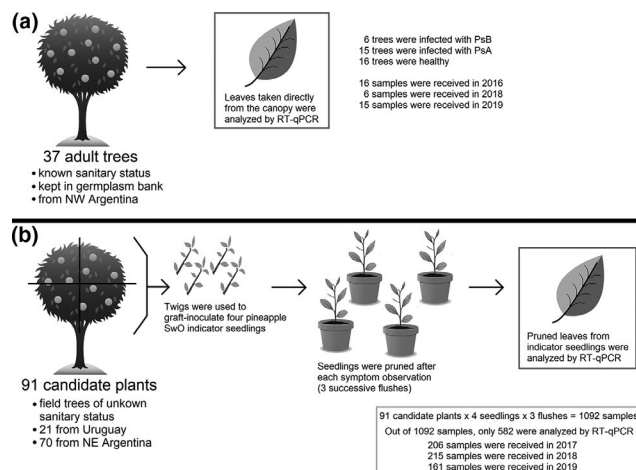
methods to assess their value as diagnostic tools, suggesting their work as a model for other plant pathogens.

The objective of this work was to evaluate detection of CPsV by RT-qPCR in comparison with the standard method of BI. For this purpose, we calculated diagnostic parameters like sensitivity, specificity, and likelihood ratios (LRs). Furthermore, concordance between the BI and RT-qPCR techniques was also evaluated using Cohen's kappa index (Cohen, 1960), the McNemar's  $\chi^2$  test, and prevalence-adjusted, bias-adjusted kappa index (PABAK) for each analytical sample.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Plant material

Plant material tested by RT-qPCR included leaves from adult germplasm bank plants and young leaves from indicator seedlings generated in the BI assays during the analysis of candidate plants (adult field trees of unknown sanitary status, Figure 1). Samples originating in the NW and NE regions of Argentina and Salto Grande, Uruguay, were provided by the Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEOC), Tucumán, Centro Único de Introducción y Saneamiento (CUI) INTA Concordia, Entre Ríos, and the Estación Experimental INIA Salto Grande, Uruguay, respectively, and were collected over 4 years (2016–2019). All samples were sent to the laboratory as blind samples. Citrus species included in this study were: *Citrus sinensis*, *P. trifoliata*, *C. sinensis* × *P. trifoliata*, *C. clementina*, *C. paradisi*, *C. limon*, and *C. reticulata* × *C. sinensis*. In total, 128 plants including healthy and infected trees with PsA and PsB syndromes were tested (Figure 1).



**FIGURE 1** Origin, type, and number of samples. In total, 128 trees were analysed, 37 adult trees taken from germplasm bank (a) and 91 field trees (candidate plants) (b). The 37 plants were diagnosed by biological indexing (BI) before the quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) technique was performed. The 91 candidate plants were analysed by BI, which generated 582 samples that were analysed by RT-qPCR. SwO, sweet orange

## 2.2 | Biological indexing assay

To test field or nursery trees for psorosis, young twigs were collected around the canopy of citrus trees, and bark chips from those sticks were used to graft-inoculate four 'Pineapple' sweet orange seedlings (Figure S1). Two additional seedlings were graft-inoculated with the PsA isolate CPsV-90-1-1 as positive control, and two more with healthy bark as negative control. Plants were pruned to force new shoots and monitored for symptom development 30–45 days later. Pruning and symptom observation were repeated in three successive flushes. To confirm whether plants were infected with psorosis, two seedlings for each candidate plant were challenge-inoculated with the PsB isolate CPsV 189-34 (from NE Argentina), which generates PsB symptoms when the challenged seedling is not protected by PsA (Figure S1). BI results were given only when the procedure was completed. Plant samples from the cross-protection assay were not analysed by RT-qPCR, because all samples would give positive results.

## 2.3 | RT-qPCR detection of CPsV

In this work, 128 trees were tested by RT-qPCR. In 37 of them, CPsV detection was performed on leaf tissue taken from the adult tree (germplasm bank). The analysis of the 91 trees (candidate plants) was done on new shoots of each indicator seedling used in the BI assay in three successive flushes, generating 582 samples (Figure 1), that is, 582 samples were new shoots from seedlings harvested after each flush and analysed by RT-qPCR, together with positive and negative controls. From the 582 analysed samples, 312 were from the first flush, 149 from the second flush, and 121 from the third flush (these include 16 positive and 8 negative controls, distributed in the three flushes). All samples were sent to the laboratory as blind samples.

For RNA extraction, leaf tissue was homogenized in TRI reagent (Sigma-Aldrich) following the manufacturer's specifications. Briefly, 100 mg of tissue were placed in a 1.5 ml tube with five 2-mm diameter glass beads. The tube was then submerged in liquid nitrogen for 60 s, the tissue was pulverized in a homogenizer, and 500 µl of TRI reagent was immediately added. The samples were mixed by tube inversion and incubated for 5 min at room temperature. One hundred microlitres of chloroform was added and vigorously shaken for 15 s, followed by incubation at room temperature for 15 min. The samples were centrifuged at 12,000 × g for 15 min at 4 °C, the aqueous phase was transferred to a new tube, and 250 µl isopropanol was added and mixed by inversion. Samples were incubated for 10 min at room temperature and centrifuged at 12,000 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, the pellet was washed with 500 µl of 75% ethanol, air-dried for 10 min, and the total RNA resuspended in 20 µl of RNase-free water. Final RNA concentration was between 0.5 and 2 µg/µl. The samples were then treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and cDNA was synthesized with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and ribonuclease

inhibitor (TransBionovo), following manufacturer's specifications. Briefly, 0.5 µg of RNA was mixed with DNase buffer, DNase, and enough nuclease-free water to reach a final volume of 5 µl (final concentrations of 0.1 µg/µl, 1×, and 0.1 U/µl, respectively), incubated at 37 °C for 30 min, and then 0.5 µl of DNase stop solution was added. After incubation at 65 °C for 10 min, cDNA synthesis was performed using the primers hpCP1C: 5'-GTTCAAGATGGAG CAAGTTGATGGA-3', hpCP3: 5'-GAGACCCTTGTA AAAACCA GCAC-3', Ubqt2: 5'-GCGTCTTCCATCCTCCAGC-3', and Ubqt1: 5'-CACCTCGTGCTTCGTCTCCG-3' (10 µM) (De Francesco et al., 2015). DNase-treated RNA was mixed with nuclease-free water and the primers. Samples were incubated for 5 min at 80 °C, and then M-MLV reverse transcriptase buffer, dNTPs, ribonuclease inhibitor, and M-MLV were added before incubating at 42 °C for 60 min, followed by 70 °C for 15 min (final concentrations of 0.4 µM for primers, 1× for M-MLV reverse transcriptase buffer, 8 U/µl for M-MLV reverse transcriptase, 2 mM for dNTPs, and 0.4 U/µl for ribonuclease inhibitor). For the real-time PCR, HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix (Solis BioDyne) solution and primers hpCP1C, hpCP3, Ubqt1, and Ubqt2 were used (final concentrations of 1× for HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix and 0.5 µM for each primer). The thermal cycler qTOWER2 from Analytik Jena AG was used.

## 2.4 | Statistical analysis

In this analysis, results of the BI diagnostic procedure were considered the true sanitary status, and thus sensitivity (Se) and specificity (Sp) were calculated for the RT-qPCR method. Se is the proportion of true positives and Sp is the proportion of true negatives correctly identified by the method. Positive and negative likelihood ratios (LR+ and LR-) were also obtained. LR+ is the ratio  $Se:(1 - Sp)$ , whilst LR- is the ratio  $(1 - Se):Sp$  (Altman, 2000). LRs are probability ratios and thus can take values higher than 1. In all cases, 95% exact binomial confidence limits were computed to test Se, Sp, positive predictive value (PV+), and negative predictive value (PV-) (Stevenson et al., 2020).

The concordance between RT-qPCR and BI results was evaluated using Cohen's kappa index (Cohen, 1960), that measures inter-rater reliability for categorical items, taking into account the possibility of the agreement occurring by chance. This index was categorized using the benchmarks of Landis and Koch (1977), where <0.00 is poor agreement, 0–0.20 is slight agreement, 0.21–0.40 is fair agreement, 0.41–0.60 is moderate agreement, 0.61–0.80 is substantial agreement, and 0.81–1.00 is almost perfect agreement.

The existence of bias was evaluated using the McNemar's  $\chi^2$  test (a nonsignificant result indicates only that there is no evidence of a systematic effect), and prevalence-adjusted, bias-adjusted kappa index (PABAK) was also calculated. This index was categorized using the same benchmarks of Landis and Koch (1977) used in the analysis of Cohen's kappa index (Cohen, 1960).

All calculations were done using R language (R Core Team, 2019) and RStudio (RStudio Team, 2018) unless otherwise specified.

### 3 | RESULTS

#### 3.1 | Agreement between BI and RT-qPCR

The two available tests, the specific CPsV detection by RT-qPCR and psorosis diagnosis by BI, were compared for 128 trees (37 mature trees and 91 candidate plants), as shown in Figure 1. In the BI assay, a citrus plant was diagnosed as psorosis-infected (BI+) when at least one of the four graft-inoculated indicator seedlings showed symptoms in young shoots, in at least two (of three) successive pruning cycles, and later confirmed by cross-protection graft-inoculation with PsB, but these PsB-inoculated seedlings were not analysed by RT-qPCR, as mentioned in Section 2.

A similar criterion was applied for RT-qPCR diagnosis, that is, a plant was considered psorosis-infected when at least one of the four graft-inoculated indicator seedlings tested positive for CPsV by RT-qPCR in at least two (of three) successive pruning cycles. The results for each method are shown in Table 1. Data showed an agreement between methods with perfect concordance, and even more importantly, the RT-qPCR technique had neither false negative nor false positive results, thus exhibiting 100% of Se, Sp, PV+, and PV-.

#### 3.2 | Monitoring indicator plants by RT-qPCR

To analyse concordance between symptom observation on each indicator seedling used in the biological indexing and the RT-qPCR, a comparison and agreement measures were calculated for 582 samples, the total samples corresponding to the first three successive flushes of the BI assay performed for the 91 candidate plants (Figure 1) together with 16 positive and 8 negative controls (Table 2).

**TABLE 1** Comparison between results for biological indexing (BI) and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) for the detection of citrus psorosis virus in 128 citrus trees (37 adult trees from germplasm bank and 91 candidate plants)

RT-qPCR	BI		Total
	+	-	
+	23	0	
-	0	105	
Total			128

Diagnostic parameter	Point estimate [95% CI]
Apparent prevalence	0.18 [0.12, 0.26]
True prevalence	0.18 [0.12, 0.26]
Sensitivity	1.00 [0.85, 1.00]
Specificity	1.00 [0.97, 1.00]
Positive predictive value	1.00 [0.85, 1.00]
Negative predictive value	1.00 [0.97, 1.00]
Positive likelihood ratio	∞
Negative likelihood ratio	0.00

McNemar  $p < .05$ , and both Cohen's kappa and PABAK fell within the range interpreted as almost perfect concordance (0.81–1.00). The results were identical in 99.14% of cases, with only five discrepancies between the tests, indicated as five false positives (Table 2). Two of these corresponded to RT-qPCR technical errors. This was corroborated by BI over the course of the assay, and by the fact that the same indicator seedlings gave negative results by RT-qPCR in the second and third flushes. The other three discrepancies were two samples of the first flush and one of the third flush corresponding to positive controls (i.e., graft-inoculated seedlings with CPsV-90-1-1-infected chips). In these cases, again the infection was confirmed over the course of the assay and coincident by both techniques in the other flushes. Among the 582 samples, only 16 correspond to positive controls and, although the symptom observation was negative in three of them, the BI was positive, because at least one of the four graft-inoculated indicator seedlings had symptoms.

To determine whether discrepancies were in a particular flush, we split the 582 samples by flush and calculated the diagnostic parameters and agreement measures for each group (Table 3). Result coincidence

**TABLE 2** Agreement measures between symptom observation and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) analysis in each indicator plant (582 samples) that were generated in the biological indexing assay of 91 candidate plants

RT-qPCR	Symptom observation		Total
	+	-	
+	32	5	
-	0	545	
Total			582

Measurement	Value
Coincidental results (%)	99.14
Cohen's kappa index	0.92 ± 0.04
McNemar $\chi^2$ test ( $p$ value)	5.00 (0.025)
PABAK ± CI <sup>a</sup>	0.98 ± 0.01

<sup>a</sup>Prevalence-adjusted, bias-adjusted kappa index ± confidence interval.

**TABLE 3** Diagnostic parameters and agreement measures between symptom observation and quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) in samples of the first, second, or third flush (582 samples)

Parameter	1st flush	2nd flush	3rd flush
Sensitivity	1	1	1
Specificity	0.993	0.993	0.988
Coincidence (%)	99.35	99.31	98.90
Cohen's kappa	0.913 ± 0.06	0.797 ± 0.08	0.917 ± 0.07
McNemar $\chi^2$ ( $p$ value)	2 (0.16)	1 (0.32)	2 (0.16)
PABAK <sup>a</sup>	0.987 ± 0.06	0.986 ± 0.07	0.978 ± 0.10
N	312	149	121

<sup>a</sup>Prevalence-adjusted, bias-adjusted kappa index ± confidence interval.

was greater than 98% in all three groups, and their corresponding kappa indices fell within the benchmarks considered almost perfect concordance (0.81–1.00), except in the second group, which fell within the benchmarks considered substantial concordance (0.61–0.80).

Bias and prevalence effects can affect the kappa coefficient. Despite the lack of systematic bias in any of the flushes (McNemar  $p > .05$  in all three cases), the same is not true for the prevalence. A prevalence effect exists when the proportion of agreements on the positive classification differs from that of the negative classification. If the prevalence index is high (as it is here, when the prevalence of a positive rating is very low) chance agreement is also high and the value of kappa is reduced accordingly (Byrt et al., 1993). Therefore, the PABAK is a more accurate agreement measure in these cases. As shown in Table 3, PABAK values were in the highest concordance range for the three flushes.

These results indicate that CPsV is detected by RT-qPCR and the BI assay with almost perfect concordance, ensuring a correct diagnosis regardless of the flush. These findings are of great significance, especially considering the accumulated experience in Argentina for three decades applying the BI method.

## 4 | DISCUSSION

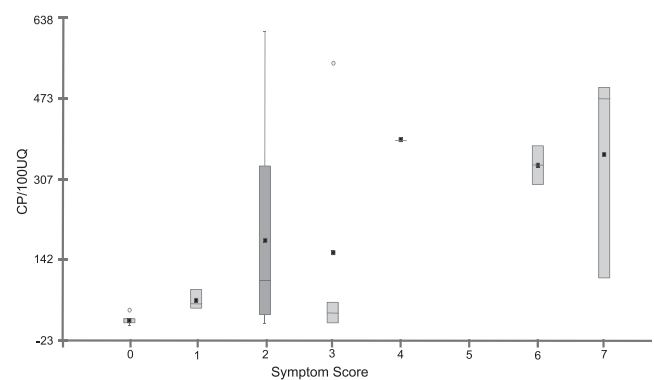
BI has been applied for more than 30 years in Argentina as the only technique for the diagnosis of psorosis disease. The fact that statistical analysis shows an almost perfect concordance between the RT-qPCR technique and the BI is proof that this molecular method can be applied to psorosis diagnostics with high sensitivity. More importantly, no false negative results were found in the analysis of 37 samples from mature trees and 582 samples from the BI seedlings, which means that the risk of psorosis spread due to plant propagation from a false negative budwood source is negligible. Moreover, the RT-qPCR protocol was able to detect CPsV in symptomless seedlings (two samples from the first flush and one from the third flush of positive controls), which suggests higher sensitivity than the BI under certain conditions. The primers used in this technique were designed from the most conserved region of the CP gene, and thus detect isolates from Argentina, Uruguay, Italy, Spain, and the USA (De Francesco et al., 2015). This shows high specificity and gives confidence that this technique could be considered universal.

We have analysed leaves taken directly from 37 plants kept in a germplasm bank with known sanitary status, that is, previously tested by BI, finding coincidence with the results of the RT-qPCR technique. Then, we analysed 582 samples generated in the BI assay of the 91 field trees to find out if the RT-qPCR could detect the virus in the three successive flushes of the BI. There were two reasons to perform this analysis. One is that samples collected from the candidate plants (field samples) were twigs, which can be conserved for days, still be infectious for graft-inoculation, and can be transported more easily than leaves from different regions

of the country. Total RNA extracted from twigs was not always in good condition, giving false negative results (data not shown). The other reason is that if samples were CPsV-positive by RT-qPCR in the first flush, the BI could be finalized at that moment, taking only 30–45 days. Moreover, analysing each flush provides important information, such as in the case of quarantine samples where BI and symptom observation in indicator plants is mandatory. Testing the samples by RT-qPCR in parallel to the BI could reduce the time consumed by BI. In our experience, despite RT-qPCR giving two false positive results, 100% of the infected samples were detected by RT-qPCR in the first flush, giving confidence that this technique is equivalent to BI as a diagnostic method for psorosis disease, because the probability of obtaining a false negative result is negligible.

In addition, we further analysed whether symptom onset occurs only above a threshold viral load. For this purpose, we compared the symptom score (SS) on a scale ranging from 0 to 9, as considered by De Francesco et al. (2020), and the viral load estimated by RT-qPCR as the number of CP gene fragments per 100 *Ubiquitin* gene fragments, used as an endogenous reference, in all 29 positive samples (Figure 2). Although five samples with less than 100 CP fragments were found with no symptoms (SS = 0), no significant association was observed between viral load and SS, probably due to the variable distribution of viral RNA in the small piece of leaf tissue taken for the analysis. This does not affect CPsV detection by RT-qPCR because this method is highly sensitive, as previously demonstrated by De Francesco et al. (2015).

As with all diagnostic methods, both CPsV detection by RT-qPCR and BI are imperfect. The RT-qPCR yielded two false positive results in 582 samples. On the other hand, three of 16 samples from positive control plants were negative by symptom observation, but



**FIGURE 2** Comparison of symptom score, according to De Francesco et al. (2020), versus number of coat protein (CP) gene fragments per 100 *Ubiquitin* gene fragments in positive samples. The grey boxes represent the range between the 25th and 75th percentile, whiskers represent the range, horizontal lines within the boxes represent the average, black squares represent the median, and empty circles represent outlying data points that were removed by the processing software. Graphic and calculations were made in Infostat software (Infostat, 2010)





positive by RT-qPCR. This result might be due to a recovery phenomenon often observed in CPsV-infected plants, in which symptoms may not develop in all flushes or are just transiently expressed. This is why several indicator plants are used in each test and symptoms are monitored in several successive flushes.

As we mentioned in the introduction section, several protocols for plant pathogen diagnosis have been developed, but the diagnostic parameters have rarely been evaluated (Vidal et al., 2012). Our results and the analyses of the diagnostic parameters indicate that CPsV detection by RT-qPCR can be used as an equivalent diagnostic method for psorosis disease. Because RT-qPCR is faster and cheaper than BI and it is amenable to large-scale sampling, our findings will be most helpful to manage virus-free certification programmes, as well as in epidemiological studies and suppression programmes, in areas where natural CPsV spread has been observed.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) PICT 2014-1007 and PICT Start UP 2014-3762, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Proyectos de Investigación de Unidades Ejecutoras—(IBBM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) X-692, and Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (PNFRU-1172; 11721; ERIOS-630081, PD I081 and RIST I091). M.S. was supported by ANPCyT and CONICET. M.L.G. belongs to CONICET and Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. We thank Beatriz Stein and Julia Figueroa from the Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEOC), Tucumán, for providing samples from their collection and Magalí Gabrielli for technical assistance in the total RNA extractions. We thank Pedro Moreno for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

## ORCID

Melina Simeone  <https://orcid.org/0000-0002-1901-5339>

Ana Bertalmio  <https://orcid.org/0000-0002-0387-2686>

Esperanza Ruiz  <https://orcid.org/0000-0001-8617-667X>

Maria L. García  <https://orcid.org/0000-0001-6468-6943>

## REFERENCES

- Alioto, D., Gangemi, M., Deaglio, S., Sposato, S., Noris, E., Luisoni, E. et al. (1999) Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathology*, 48, 735–741.
- Altman, D.G. (2000) Diagnostic tests. In: Altman, D.G., Machin, D., Bryant, T.N. and Gardner, M.J. (Eds.) *Statistics with Confidence*, 2nd edition. London, UK: British Medical Journal, pp. 105–118.
- Byrt, T., Bishop, J. & Carlin, J.B. (1993) Bias, prevalence and kappa. *Journal of Clinical Epidemiology*, 46, 423–429.
- Cohen, J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, 20, 37–46.
- Danós, E. (1990) La psorosis de los cítricos: la epidemia en curso en Argentina y el desafío de su control. In: International Foundation for Science (IFS) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (Eds.) *Revista RIA*, 22, 265–277.
- De Francesco, A., Costa, N., Plata, M.I. & García, M.L. (2015) Improved detection of citrus psorosis virus and coat protein-derived transgenes in citrus plants: comparison between RT-qPCR and TAS-ELISA. *Journal of Phytopathology*, 163, 915–925.
- De Francesco, A., Simeone, M., Gómez, C., Costa, N. & García, M.L. (2020) Transgenic sweet orange expressing hairpin CP-mRNA in the interstock confers tolerance to citrus psorosis virus in the non-transgenic scion. *Transgenic Research*, 29, 215–228.
- Derrick, K.S., Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. & Nguyen, T.K. (1988) Two components associated with the citrus ringspot virus. In: *Proceedings of the 10th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Riverside, CA: IOCV, pp. 340–342.
- Diamante de Zubrzycki, A., Zubrzycki, H.M. & Correa, M. (1984) Determination of the distribution of psorosis in commercial plantings. In: Garnsey, S.M., Timmer, L.W. & Dodds, J.A. (Eds.) *Proceedings of the 9th Conference of the International Organization of Citrus Virologists, 9–13 May 1983*. Riverside, CA: IOCV, pp. 165–170.
- Fawcett, H.S. (1933) New symptoms of psorosis indicating a virus disease of citrus. *Phytopathology*, 23, 930.
- Fawcett, H.S. & Klotz, L.J. (1938) Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology*, 32, 22.
- García, M.L., Dal Bó, E., Da Graça, J.V., Gago-Zachert, S., Hammond, J., Moreno, P. et al. (2017) ICTV virus taxonomy profile: *Ophioviridae*. *Journal of General Virology*, 98, 1161.
- García, M.L., Grau, O. & Sarachu, A.N. (1991) Citrus psorosis is probably caused by a bipartite ssRNA virus. *Research in Virology*, 142, 303–311.
- García, M.L., Sánchez de la Torre, M.E., Dal Bo, E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E. et al. (1997) Detection of citrus psorosis-ringspot virus using RT-PCR and DAS-ELISA. *Plant Pathology*, 46, 830–836.
- Infostat (2010) *Estadística y Biometría y Diseño de Experimentos*. Universidad Nacional de Córdoba (FCA-UNC).
- Kokane, A., Kokane, S., Warghane, A., Gubyad, M., Sharma, A.K. & Ghosh, D.K. (2020) A rapid and sensitive reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for the detection of Indian citrus ringspot virus. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE>
- Landis, J.R. & Koch, G.G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33, 159–174.
- Loconsole, G., Saponari, M. & Savino, V. (2010) Development of real-time PCR based assays for simultaneous and improved detection of citrus viruses. *European Journal of Plant Pathology*, 128, 251–259.
- Moreno, P., Guerri, J. & García, M.L. (2015) The psorosis disease of citrus: a pale light at the end of the tunnel. *Journal of Citrus Pathology*, 2, 1–18.
- Navarro, B., Minutolo, M., De Stradis, A., Palmisano, F., Alioto, D., Di Serio, F. et al. (2018) The first phlebo-like virus infecting plants: a case study on the adaptation of negative-stranded RNA viruses to new hosts. *Molecular Plant Pathology*, 19, 1075–1089.
- Navas-Castillo, J. & Moreno, P. (1993) Biological diversity of citrus ringspot isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42, 347–357.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. & Cambra, M. (2007) Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Punja, Z.K., De Boer, S. and Sanjaon, H.I. (Eds.) *Biotechnology and Plant Disease Management*. Wallingford, UK: CABI Publishing, pp. 227–249.
- Osman, F., Hodzic, E., Kwon, S.J., Wang, J. & Vidalakis, G. (2015) Development and validation of a multiplex reverse transcription



- quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the rapid detection of *Citrus tristeza virus*, *Citrus psorosis virus*, and *Citrus leaf blotch virus*. *Journal of Virological Methods*, 220, 64–75.
- Pallas, V., Aparicio, F., Herranz, M.C., Sanchez-Navarro, J.A. & Scott, S.W. (2013) The molecular biology of ilarviruses. *Advances in Virus Research*, 87, 139–181.
- R Core Team (2019) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at: <https://www.R-project.org/> [Accessed 11 January 2021].
- Roistacher, C.N. (1993) Psorosis – a review. In: Moreno, P., da Graca, J.V. & Timmer, L.W. (Eds.). *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, 23–27 November 1992. Riverside, CA: IOCV, pp. 139–154.
- RStudio Team (2018) *RStudio: Integrated Development for R*. Boston, MA: RStudio, Inc. Available at: <http://www.rstudio.com/> [Accessed 11 January 2021].
- Sackett, D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H. & Tugwell, P. (1991) *Clinical Epidemiology: A Basic Science for Clinical Medicine*, 2nd edition. Boston, MA: Little Brown.
- Stevenson, M., Nunes, T., Heuer, C., Marshall, J., Sanchez, J. et al. (2020) *epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data. R package version 1.0-14*. Available at: <https://CRAN.R-project.org/package=epiR> [Accessed 11 January 2021].
- Swingle, W.T. & Webber, H.J. (1896) *The Principal Diseases of Citrus Fruits in Florida*. USDA Division of Vegetable Physiology and Pathology. Bulletin 8.
- Velázquez, K., Hervàs, A., Pina, J.A., Moreno, P., Guerri, J., Navarro, L. et al. (2019) Complete sequence of three phlebo-like viruses associated to Cristacortis, Concave gum and Impietratura diseases. In: *Proceedings of the 2019 Conference of the International Organization of Citrus Virologists*, Abstract IOCV-O2-02.
- Vidal, E., Yokomi, R.K., Moreno, A., Bertolini, E. & Cambra, M. (2012) Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*: a model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102, 114–121.
- Wallace, J.M. & Drake, R.J. (1968) Citrange stunt and ringspot, two previously undescribed virus diseases of citrus. In: *Proceedings of the 4th Conference of the International Organization of Citrus Virologists*. Gainesville, FL: University of Florida Press, pp. 177–183.
- Warghane, A., Misra, P., Bhose, S., Biswas, K.K., Sharma, A.K., Reddy, M.K. et al. (2017) Development of a simple and rapid reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for sensitive detection of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virological Methods*, 250, 6–10.
- Zanek, M.C., Peña, E., Reyes, C.A., Figueroa, J., Stein, B., Grau, O. et al. (2006) Detection of *Citrus psorosis virus* in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 137, 245–251.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

**How to cite this article:** Simeone M, Gómez C, Bertalmío A.

Detection of citrus psorosis virus by RT-qPCR validated by diagnostic parameters. *Plant Pathol.* 2021;70:980–986. <https://doi.org/10.1111/ppa.13341>



# Transgenic Sweet Orange expressing hairpin CP-mRNA in the interstock confers tolerance to citrus psorosis virus in the non-transgenic scion

A. De Francesco · M. Simeone · C. Gómez · N. Costa · M. L. García 

Received: 25 September 2019 / Accepted: 13 January 2020  
© Springer Nature Switzerland AG 2020

**Abstract** The lack of naturally occurring resistance to citrus psorosis virus (CPsV) necessitates a transgenic approach for the development of CPsV-resistant citrus. To evaluate the feasibility of conferring resistance to a non-transgenic scion, we have assembled citrus plants by grafting combining a non-transgenic Sweet Orange as scion, CPsV-resistant transgenic Sweet Orange lines expressing intron-hairpin (ihp) RNA derived from the viral coat protein (ihpCP) as interstock, and a non-transgenic citrus as rootstock. We demonstrated that ihpCP-transcripts translocate through the graft from interstock to scion, triggering the silencing of coat protein mRNA target. Two independent CPsV challenge assays showed that

expression of ihpCP in the interstock provides resistance against CPsV in the interstock, and different levels of protection in the non-tg scion, depending of the virus delivery site. These results indicated that grafting is a promising biotechnological alternative to protect woody plants against virus infections in vegetative propagated plants.

**Keywords** Citrus psorosis virus · Hairpin-RNA · Transgenic Sweet Orange · Virus resistance · Silencing

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11248-020-00191-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

---

A. De Francesco · M. Simeone · M. L. García (✉)  
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, CCT-La Plata, CONICET - UNLP, calles 47 y 115 (1900),  
La Plata, Buenos Aires, Argentina  
e-mail: [garcia\\_m@biol.unlp.edu.ar](mailto:garcia_m@biol.unlp.edu.ar)

A. De Francesco  
Department of Microbiology and Plant Pathology,  
University of California, Riverside, CA 92521, USA

C. Gómez · N. Costa  
Estación Experimental Agropecuaria, INTA Concordia,  
Ruta Provincial 22 y vías del Ferrocarril (3200),  
Concordia, Entre Ríos, Argentina

## Introduction

Citrus are affected by many serious graft-transmissible diseases, with citrus psorosis being one of the oldest diseases worldwide, with varying incidence and impact on productivity (Moreno et al. 2015). Likely owing to natural spread by an unidentified vector and its graft-transmissible condition, psorosis has been endemic in Argentina and Uruguay for decades, reducing fruit production and causing economic losses (Anderson 2000; Zaneke et al. 2006). Typical psorosis symptoms include bark scaling, pustules and gum accumulation on the trunk; flecking and chlorotic spots in leaves, and necrotic shock of young shoots. Leaf symptoms are observed in graft-inoculated Sweet Orange seedlings, which made it serve as biological

indicators for psorosis indexing (Roistacher 1991). Citrus psorosis is caused by citrus psorosis virus (CPsV), the type member of the genus *Ophiovirus*, family *Aspiviridae* (García et al. 2017). The particles are filamentous and circular (García et al. 1994; Milne et al. 2000) and the genome has three single-stranded RNAs of negative polarity, encapsidated by a coat protein (CP) (García et al. 2017). RNA1 encodes the replicase (Naum-Ongania et al. 2003) and the 24KDa protein, involved in microRNA processing and silencing suppression (Reyes et al. 2015; Robles Luna et al. 2017). RNA2 encodes the movement protein that is a silencing suppressor (Robles Luna et al. 2013, 2017); and RNA3 encodes the CP, which is the most abundant viral protein in citrus infected tissue (Sánchez de la Torre et al. 1998; Robles Luna et al. 2013).

Transgenic plants resistant to viruses by expression of intro-hairpin constructs (inducers of RNA silencing) have been widely used to manage virus diseases (Fire 1999; Smith et al. 2000; Guo et al. 2016; Yousif Gaffar and Koch 2019). This strategy was successfully applied in several crops (Helliwell and Waterhouse 2003; Kamthan et al. 2015) with the accumulation of transgene-derived siRNAs being regarded as a predictor of resistance to virus infection by RNA silencing (Kalantidis et al. 2002). Previously, we developed highly resistant transgenic Sweet Orange plants (*Citrus sinensis*) coding hairpin-RNA from the CPsV coat protein (ihpCP) (Reyes et al. 2011). In that work, we propagated several ihpCP transgenic lines by grafting on a non-transgenic rootstock (Rough Lemon), as usually done in citrus clonal propagation. When ihpCP lines were challenged with CPsV by graft-inoculation on the transgenic scion, neither CP protein nor viral RNAs were detected at different times post-infection, suggesting that CPsV multiplication had been inhibited. More recently, we reported the stability of transgene expression and siRNA production over time and propagation of the two most CPsV-resistant ihpCP lines (ihpCP-10 and -15), finding resistance against psorosis A and B isolates, the latter producing more severe symptoms (De Francesco et al. 2017).

In this work, we used a triple plant system generated by grafting to demonstrate ihpCP-transcript translocation through the graft, silencing induction in the scion by the expression of ihpCP in the interstock, and protection to the non-transgenic scion against CPsV.

## Materials and methods

Viral isolates, transgenic lines, citrus preparation, CPsV-graft-inoculation and symptom observation

Challenge assays with viral inoculation were performed with the Argentine CPsV 90-1-1 isolate from EEA INTA Concordia collection (Entre Ríos, Argentina). Transgenic citrus used in this work express genome sequences from CPsV 90-1-1: Pineapple Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing a hairpin of the CPsV coat protein, ihpCP-10 and -15 lines (Reyes et al. 2011); and CPV4 from United States: Pineapple Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) expressing the full-length mRNA of the CPsV coat protein, CP-18 line, generated by Zaneck et al. (2008).

Citrus trees were prepared by bud-grafting, over the course of 3 years. The transgenic (tg) lines, ihpCP-10 and -15 and non-transgenic (non-tg) were propagated onto 10–12-month-old non-tg Rough Lemon (*Citrus jambhiri* Lush) seedlings. When scions grew beyond 30 cm (after 10–12 months), plants were pruned and non-tg Pineapple Sweet Orange buds were grafted on them, leaving the transgenic ihpCP lines as interstock (Fig. S1). Non-transgenic trees were prepared in the same way as control. Leaf and bark tissues were taken from the different parts of the plant for molecular analysis.

Triple plants were inoculated by grafting on the interstock or in the non-transgenic scion with one piece of CPsV-infected bark. The grafted inoculum piece remained throughout the entire challenge period. Symptoms were evaluated on young leaves of CPsV-inoculated plants and non-inoculated controls. In order to force foliage development and evaluate the progression of the CPsV-infection in the new flush, plants were pruned after each flush (around 30- and 50–70-days post-inoculation). The collected leaves were used for molecular analysis and CPsV-detection.

A symptom-severity scale for CPsV was defined ranging from 1 to 6, following Reyes et al. (2016) and De Francesco et al. (2017). The scores assigned in the scale were: Mild flecking, mild variegated and mild spots (+) = 1; moderate flecking, moderate variegated and moderate spots (++) = 2; severe flecking, severe variegated and severe spots (+++) = 3; mild shock (+) = 4; moderate shock (++) = 5 and severe shock (++++) = 6 (Fig. 3). The overall sum was made for

each group of plants and divided by the number of individuals assayed in each group.

### In silico analysis

Sequence alignments of the ihpCP region from CPsV isolate 90-1-1 and CPV4 RNA3 (GenBank accession numbers FJ495195.1 and AF060855, respectively) were obtained using the Clustal 2.1 multiple sequence alignment algorithm. The effective silencing RNA (siRNA), potentially produced by the ihpCP transgene, was predicted in silico using the siRNA design tool (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>) and Block-iT RNAi Designer software (<https://rnaidesigner.invitrogen.com/rnaexpress>).

### RNA isolation and cDNA synthesis

To extract total RNA, 200 mg of citrus tissue (leaf or bark) was ground in liquid nitrogen, mixed with 1 ml of TRI Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) and processed according to the manufacturer's instructions. RNA extracts were re-suspended in 25 µl of RNase-free water and quantified by absorbance at 260 nm. Two microgram aliquots of total RNA were digested with RQ1 RNase-free DNase (PROMEGA, Madison, WI, USA) for 1 h at 37 °C in a final volume of 10 µl, following the manufacturer's specifications. After DNase treatment, 5 µl of the preparations containing 1 µg of total RNA were retro-transcribed (RT) with Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase (PROMEGA) in a final volume of 25 µl. Reactions were conducted using specific or reference primers, dNTPs, buffer, and enzyme, at the concentrations specified by the manufacturer, and 12 units of RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), for 1 h at 42 °C. To confirm the efficiency of DNase treatment, qPCR was performed without previous cDNA synthesis and considered as a negative control of RT-qPCR assays (De Francesco et al. 2015).

### Transcript detection

The ihpCP transcript expression was measured by RT-qPCR in five individuals of each line (in three independent determinations, with technical duplicates). SYBR green-based RT-qPCR was performed as described by De Francesco et al. (2015), using

specific CPsV primers CP1c/CP3 and *Citrus sinensis* ubiquitin for normalization, with ubqtL/ubqtR primers. Copy numbers were calculated by extrapolating Ct values on calibration curves and expressed as relative copy number (number of copies of amplicon divided by 100 copies of ubiquitin).

Similarly, the CP-mRNA was measured by RT-qPCR using 55/C1 primers, in a different region of the CP gene, to distinguish them from the ihpCP-transcript, as performed for CPsV detection (described below). The sequences of all the primers used in this work are listed in Table 1.

### siRNA isolation and Northern blot

The abundance of siRNA was monitored by Northern blot analysis. Total RNA was extracted with TRI Reagent (Molecular Research Center), as described above, from 1 g of citrus leaves pooled from all replicates. RNA (100 µg) from each pooled sample was separated on 17% polyacrylamide gels containing 7 M urea and 0.5X TBE buffer (tris 50 mM, boric acid 45 mM, EDTA 0.5 mM) and transferred to a positively charged nylon membrane (Roche Diagnostics Corporation, IN, USA) by a Bio-Rad (Hercules, CA, USA) transfer unit, and then chemically fixed, according to Pall and Hamilton (2008). The probe was <sup>32</sup>P-radiolabelled oligodeoxynucleotides complementary to the ihpCP sequence (primers CP1c, CP3, hpCP1b and hpCP2b). Hybridisation was performed at 45 °C overnight, and after washing, the membrane was exposed, and signals were detected by autoradiography.

### CPsV detection

Virus infection was tested in leaf tissue by RT-PCR amplifying viral RNAs, triple-sandwich immunoassay (TAS-ELISA) for CP protein quantification and RT-qPCR on cp gene (RNA3). RT-PCR was performed with A/B primers to detect RNA2, and 24ks-arg1/24kas-arg1 primers for RNA1, amplifying a 370 bp and 151 bp fragments, respectively. cDNA was synthesized as described above, using 1 µl of cDNA as the template. PCR was performed in a Perkin-Elmer 2400 apparatus. The thermo-cycling conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min; followed by 35 cycles at 94 °C for 10 s, 50 °C for 10 s and 72 °C for 50 s (cycling for RNA2) and 40 cycles at 94 °C for 20 s,

**Table 1** Primer sequences used for CPsV and ihpCP-mRNA/siRNA detection

Primer name	Sequence	Used in this work for
CP1c**	5'GTTCAAGATGGAGCAAGTTGATGG3'	Northern blot, ihpCP-transcript detection
CP3**	5'GAGACCTTGTGTA AAAAACCAGCAC3'	Northern blot, ihpCP-transcript detection
ubqtL**	5'TCTTCACCTCGTGCTTCGTCTCCGT3'	Citrus reference gene for RT-qPCR
ubqtR**	5'GTCCTGGATCTTGGCCTTGACGTTG3'	Citrus reference gene for RT-qPCR
hpCP1b*	5'AATCCTCGAGCTTGTTCAAGATGGAGC3'	Northern blot
hpCP2b	5'GGAGCATGGCTCAGCTCCTCACTG3'	Northern blot
A*	5'TAGATCCATGCTCAGTACC3'	CPsV detection RNA2
B*	5'TTGACAATGATGGACACTGG3'	CPsV detection RNA2
24ks-arg1***	5'ATGGCTGAATATATAGAAGT3'	CPsV detection RNA1
24kas-arg1***	5'TCCAAATTCCTATTATCCTGG3'	CPsV detection RNA1
55i	5'GAAATCAATTGCAATAAGAGA3'	CP-transcript and CPsV-RNA3 detection
C1*	5'TCTGCCATCTGGAGTAAGGC3'	CP-transcript and CPsV-RNA3 detection

\*Published in Reyes et al. (2011); \*\*Published in De Francesco et al. (2015); \*\*\*Published in Reyes et al. (2016); no asterisk: this work

58 °C for 30 s and 72 °C for 20 s (cycling for RNA1); with a final elongation step at 72 °C for 2 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 2% (w/v) TAE agarose gel stained with ethidium bromide.

RT-qPCR was used to quantify viral titer using 55i/C1 primers, designed outside the ihpCP region. Cycle conditions were: initial denaturation at 94 °C for 5 min followed by 40 cycles at 94 °C for 20 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 20 s. Copy numbers were calculated by extrapolating Ct values on calibration curves and expressed as relative copy number (number of copies of amplicon 55i/C1 divided by 100 copies of ubiquitin).

TAS-ELISA was carried out as previously described (De Francesco et al. 2015), with A376 polyclonal antiserum at 1/7500 dilution, monoclonal antibody 13C5 (IgG) at 1/10,000 dilution, and conjugated antibody, goat anti-mouse-HRP IgG (H + L) peroxidase conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA) at a dilution of 1/2500. Each sample was analyzed in triplicate, from the same extract. Control samples were also prepared: infected plants, positive control; healthy, non-tg, non-inoculated plants and extraction buffer as negative controls. Optical density (OD) values three times the average of the healthy, non-tg, non-inoculated control (H) were considered positive for detection and diagnosis of CPsV (Zanek et al. 2006). TAS-ELISA values

were expressed as the ratio of inoculated replicates (I) to (H), i.e.  $OD^I/OD^H$ .

#### Statistical analysis

Statistical analysis was performed through a one-way ANOVA test with 95% confidence i.e. significance set at  $P < 0.05$ . Tukey's HSD test with  $P < 0.05$  was applied for pairwise comparisons.

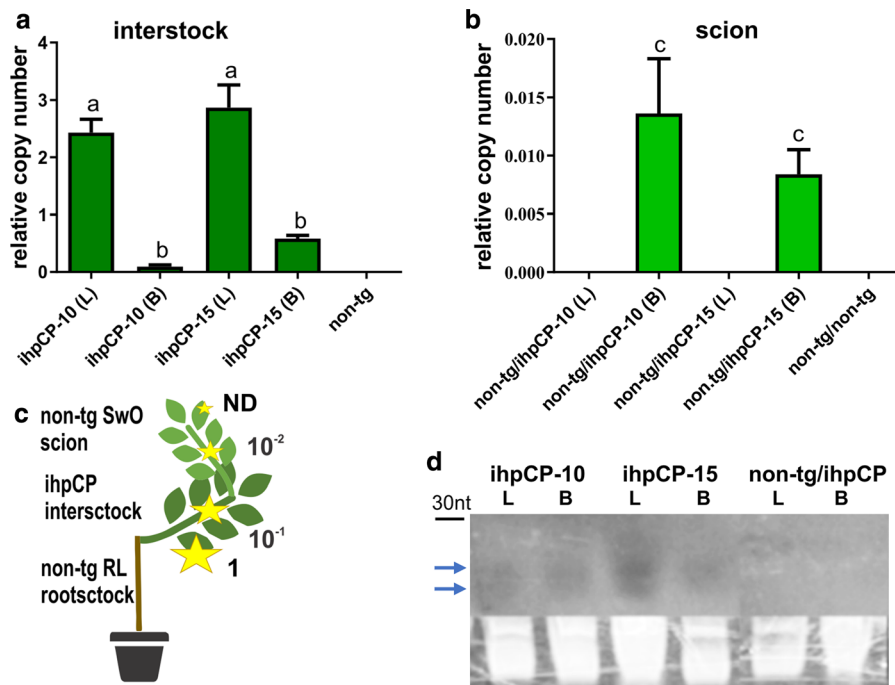
## Results

ihpCP-transcript synthesized in the interstock translocates through the graft

The main goal of the work was to obtain CPsV-resistant citrus trees, with non-transgenic (non-tg) citrus scions grafted onto transgenic (tg) rootstocks. We previously found that ihpCP tg plants accumulate transgene-derived siRNAs (ihpCP-siRNAs) in addition to accumulating ihpCP-transcript in leaves (Reyes et al. 2011; De Francesco et al. 2015, 2017). To assess whether the ihpCP-transcript and ihpCP-siRNA were able to move through the graft and reach the scion, we generated combined citrus trees by grafting, with a non-transgenic Rough Lemon as rootstock, transgenic lines ihpCP-10 or -15 as interstock, and non-transgenic Sweet Orange as scion, hereinafter referred to as

“triple plant” (Fig. S1). We analyzed the presence of ihpCP-transcript and ihpCP-siRNA in scions and interstocks by RT-qPCR and Northern blot, but due to management and pruning performed to prepare the triple plants, Rough Lemon rootstocks often did not develop foliage to be analyzed. Three independent analyses of each pooled group of plants were performed. Samples of the scions and interstocks, leaves and the branch containing these leaves (bark), were taken at least 10 cm from the graft area. The average values of ihpCP-transcript copies by 100 copies of ubqt was determined by RT-qPCR (Fig. 1). Thus, 2.4 and 2.9 copies/100 ubqt were found in the leaves of ihpCP-10 and -15 interstocks, respectively; 0.09 and

0.6 for their branches; 0.01 and 0.008 for bark tissue of scions of both groups of triple plants, respectively, while no amplification was observed in leaves of scions of both triple plants (Fig. 1b). Non-tg interstocks and scions (non-tg triple plants) did not show amplification (Fig. 1a, b). Considering the overall expression levels in each group of tissues, there is a 10-fold copy number decrease from leaves to branches in the interstock, and from branches of interstock to branches of scion, being undetectable in the leaves of these scions (Fig. 1c). This decreased abundance of ihpCP-transcript from the tg interstock to the non-tg scion suggests that the ihpCP-transcript synthesized in the transgenic interstock (ihpCP leaves) is transported



**Fig. 1** Translocation of ihpCP-transcript and ihpCP-siRNA from ihpCP-10 and -15 interstocks to non-tg Sweet Orange scions. **a** ihpCP-mRNA measured by RT-qPCR in leaves (L) and young bark stems (B) of ihpCP-10 and -15 interstocks and the non-tg control; **b** ihpCP-mRNA measured in the scions of the same triple plants (non-tg/ihpCP) and the non-tg control (non-tg/non-tg). Relative copy number was calculated as number of copies of amplicon CP1c/CP3 by 100 copies of ubiquitin. Standard error is indicated on top of the bars. A pairwise Tukey’s test was performed with  $p$  value < 0.05 to determine significant differences (upper letters a, b and c). Leaf tissue of scions did not show amplification, as well as the non-tg control **c** scheme of ihpCP-transcript level through the triple plants. ihpCP transcripts are represented with stars whose sizes correspond with relative ihpCP transcript accumulation.

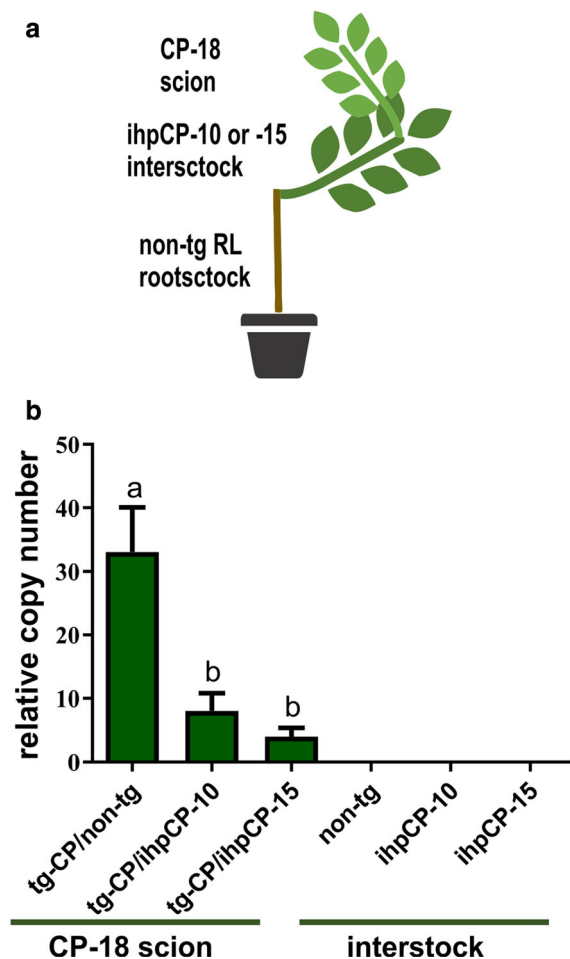
Considering the overall expression levels and normalizing to 1 (ihpCP-mRNA copy number) in the leaves of the ihpCP-interstocks,  $10^{-1}$  was accumulated in their branches,  $10^{-2}$  in the branches of the scions and, undetectable (ND, no detected) in the leaves of these scions, showing an ihpCP-mRNA concentration gradient from the interstock to the scion. **d** Northern blot analysis of ihpCP-siRNA accumulation in the interstocks and non-tg scions. RNA samples were blotted and hybridized with ihpCP-derived oligonucleotide radiolabeled with  $\gamma^{32}$ ATP. L (leaves) and B (young bark stems) tissues of: ihpCP-10 and -15 interstocks, and the pool of non-tg scions grafted onto ihpCP interstocks are indicated. DNA oligonucleotide of 30 nt was used as molecular weight marker. Bands of ihpCP-siRNA are indicated by arrows. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as loading control

to the scion. As distance from the ihpCP-leaves increases, the ihpCP-transcript abundance decreases in what can be considered as a dilution effect, with no apparent accumulation of this transcript in the non-tg scion.

We further analyzed the accumulation of siRNAs in leaf and bark tissue by Northern blot (Fig. 1d). The presence of siRNA was confirmed in leaf and bark tissues of both ihpCP interstocks. The ihpCP-15 line shows higher accumulation of ihpCP-siRNA in leaf tissue than in the bark, but this difference was not observed in the ihpCP-10 line. No siRNA was detected in leaf or bark of the non-tg scions grafted onto the ihpCP interstocks via Northern blot assay. These results are consistent with the observed dilution effect of the ihpCP-transcript from the ihpCP leaves of the interstock (source) to the non-tg scion (sink).

#### ihpCP interstock induces CP-mRNA silencing on the scion

We wanted to know whether the silencing signal (siRNAs and/or ihpCP-transcript) generated in the tg interstock could trigger the silencing of homologous targets in the scion. To that effect, a different set of triple plants was prepared as shown in Fig. 2a: a non-tg Rough Lemon as rootstock, tg lines ihpCP-10 and -15 as interstock, and a transgenic Sweet Orange expressing the full-length mRNA of the CPsV coat protein (CP-18 line) generated by Zanek et al. (2008), which could function as CP-target in the scion. Since the CP-18 line expresses CP-mRNA from CPV4 isolate, while ihpCP lines express ihpCP-transcript from the CPsV 90-1-1 isolate, with 85% homology between both isolates, we hypothesized that there should be enough similarity to trigger silencing, and then, analyzed in silico the ability of the signal to silence that CP-target. Two siRNA prediction tools were used, and the top high score predicted ihpCP-siRNAs were aligned with the CPV4 RNA3 sequence. Results shown in Table S1 indicate that top-8 effective siRNA potentially produced from ihpCP transcript match the CPV4 CP-target, albeit with one to four non-homologous nucleotides, suggesting that the CP-mRNA of CPV4 isolate could likely be silenced by the transgene. Based on this prediction, we analyzed the triple plants with CP-18 line as scion. The CP-mRNA was quantified by RT-qPCR amplifying a CP fragment outside the ihpCP region, in order to distinguish it



**Fig. 2** CP-mRNA silencing in the CP-scion induced by ihpCP-interstocks. **a** Scheme of triple plants generated by grafting, with a non-tg RL rootstock, lines ihpCP-10 or -15 as interstock and the transgenic line 18 expressing the full-length *cp* gene from CPsV (tg-CP) as a scion. **b** Quantification of CP-mRNA by RT-qPCR expressed as relative copy number (copies of 55i/C1 amplicon by 100 copies of ubiquitin), in leaves of the tg-CP scion grafted onto non-tg (tg-CP/non-tg) and tg ihpCP interstocks (tg-CP/ihpCP-10 and tg-CP/ihpCP-15) and leaf tissues of their respective interstocks (non-tg, ihpCP-10 and ihpCP-15) as controls. The upper bars indicate the standard error. A pairwise Tukey's test was performed with  $p$  value < 0.05 to determine significant differences by RT-qPCR (upper letters a and b)

from the ihpCP-transcript, comparing expression levels when the CP-18 scions are grafted onto either non-tg or ihpCP-interstock (Fig. 2b). Two independent determinations were performed. CP-18 scions grafted onto non-tg interstock showed an average value of 33 copies of CP-mRNA/100 ubqt copies, whereas in the ones grafted on ihpCP-10 and -15



interstocks, the CP-mRNA copies decreased 8 and 4 times, respectively. There were no significant differences between the CP-mRNA levels found on CP-18 scions with ihpCP-10 and inpCP-15 lines as interstocks (b group in the Tukey's pairwise comparison). These results confirm that the silencing signal generated in the ihpCP-10 and -15 interstocks moves through the graft to the scion inducing the silencing of the CP-mRNA target.

Triple plants are resistant to CPsV when inoculated in the interstock

A complete resistance of the ihpCP transgenic plants against CPsV-infection was shown by Reyes et al. (2011), and against psorosis B syndrome by De Francesco et al. (2017), when propagated onto Rough Lemon rootstock. In this work we further challenged the ihpCP-10 and -15 lines as interstocks in triple plants, with non-tg Sweet Orange scions grafted onto them (Fig. S1) and evaluated the acquired resistance in those non-tg scions. To that effect, triple plants were inoculated with the homologous CPsV 90-1-1 isolate by grafting on the tg interstock followed by pruning to force new leaf development. Ten replicates of each group of triple plants were inoculated, with two replicates kept as non-inoculated controls. After flushing, the infection was evaluated individually by psorosis symptom observation and virus accumulation determined by molecular and serological methods. Psorosis symptom expression was observed in the interstock and scion of each inoculated triple plant at 14, 28, and 55 days post-inoculation (dpi) (Table 2). Figure 3 shows examples of symptoms corresponding to the calculated score. The overall sum of symptom score in the different groups was divided by number of individuals in each group and plotted (Fig. 4a). Non-inoculated controls remained asymptomatic.

The group of ihpCP-10 interstocks showed symptom in 1/10 individuals, with faint spots at 14 and 28 dpi, and became asymptomatic at 55 dpi. All the ihpCP-15 interstocks were totally asymptomatic throughout the evaluation period, while the non-tg interstocks showed characteristic foliar symptoms of psorosis (scores 2–5) in two of three individuals persisting during the evaluation. The remaining non-tg control became symptomatic during the assay. These results do not differ from our previous reports (Reyes et al. 2011; De Francesco et al. 2017) showing

complete resistance in the ihpCP transgenic tissue, now as interstock of triple plants.

The symptom scores for the scions of triple plants with ihpCP-interstock showed weak symptoms at 14 and 28 dpi with scores of 1–2 in two of five scions of ihpCP-15 triple plants and four of ten scions on ihpCP-10 interstocks. At 55 dpi, the symptom score was zero for ihpCP-15 triple plants (no symptoms), and 1/10 scions of the ihpCP-10 triple plants showing faint spots (Fig. 4a, scion). Moreover, scions showed a complete recovery while in non-transgenic controls recovery was not observed but characteristic symptoms of CPsV 90-1-1 isolate on Sweet Orange with scores of 2-6 in three of five triple plants were observed. The attenuation of psorosis symptom expression and later recovery, demonstrates the protective effect of transgenic tissue for scion against the virus.

To confirm these results, CPsV infection was tested in leaf samples at 55 dpi by TAS-ELISA for CP detection as a measure of virus multiplication, and by RT-PCR for RNA1, RNA2 and RNA3 detection (Fig. 4b). Only scions and interstocks of non-tg controls yielded TAS-ELISA values above 3, considered positive for CPsV (Fig. 4b). On the contrary, all ihpCP interstocks and their non-tg scions were negative, with  $OD^i/OD^h$  values close to 1, indistinguishable from the non-tg non-inoculated control. TAS-ELISA and RT-PCR detection of RNA3 were consistent. In addition, since CPsV is a multipartite virus and the RNA1 and 2 are not the silencing target, we wondered whether these two viral RNAs could replicate in the absence of RNA3. Results were negative for RNA1 and RNA2, and consistent with the absence of RNA3 detection, while the non-tg controls showed amplification (Fig. 4b, lower panel). According to these results, none of the viral RNAs were able to replicate in ihpCP interstocks and their non-tg scions, indicating that ihpCP tissues are also resistant to CPsV as interstocks, in a double-grafting context, protecting a non-tg scion when inoculated in the transgenic interstock.

The silencing status of these triple plants was determined during the CPsV-challenge. Leaf material was taken from interstocks and scions at 55 dpi and the siRNA accumulation was analyzed by Northern blot in pooled groups of ihpCP interstocks, non-tg interstocks, and non-tg scions onto ihpCP tissues, before and after CPsV-inoculation. Results shown in Fig. 4c

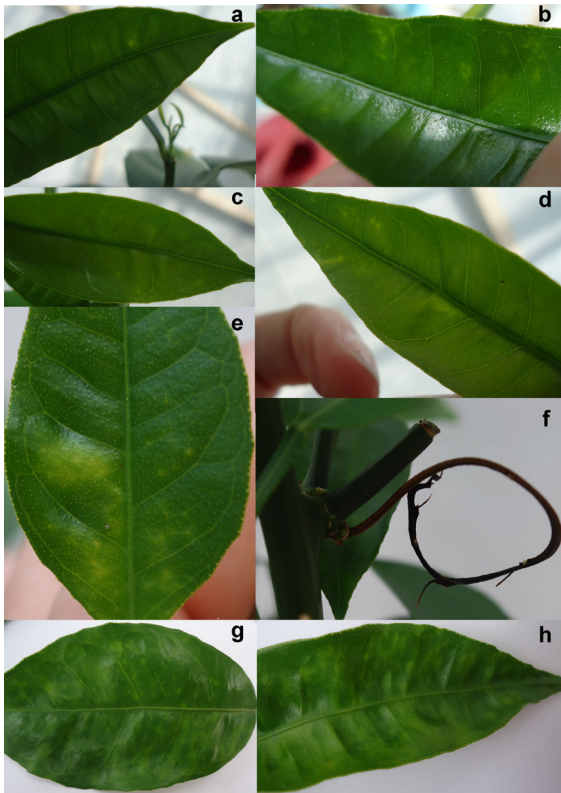
**Table 2** Symptom scores in triple plants challenged by CPsV in the interstock

Plant #/ dpi	ihpCP-10			ihpCP-15			non-tg		
	14	28	55	14	28	55	14	28	55
1									
<b>sci</b>	Sp+ (1)	<b>Sp+ V+</b> (2)	Sp+ (1)	Sp+ (1)	<b>Sp+ F+</b> (2)	H (0)	S++ (5)	<b>S+++ (6)</b>	S++ (5)
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	Sp+ (1)	<b>Sp+++ F+++</b> (5)	Sp++ F+++ (5)
2									
<b>sci</b>	Sp+ (1)	Sp+ (1)	H (0)	Sp+ (1)	<b>Sp+ (1)</b>	H (0)	H (0)	F+ (1)	F+ S+ (4)
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	Sp+ (1)	Sp+ (1)	Sp+ (1)
3									
<b>sci</b>	H (0)	Sp+ (1)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f
4									
<b>sci</b>	H (0)	Sp+ (1)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	Sp+ V+ (2)	<b>Sp+++ V+ (3)</b>	Sp+++ V+ (3)
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	Sp+ (1)	Sp+ F+ (2)	Sp+ F+ (2)
5									
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	F++ (2)	F++ (2)	F++ (2)
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f
6									
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)			
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f			
7									
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)			
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f			
8									
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)			
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f			
9									
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)			
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f			
10									
<b>sci</b>	Sp+ (1)	<b>Sp+ (1)</b>	H (0)	H (0)	H (0)	H (0)			
<i>int</i>	H (0)	H (0)	H (0)	n/f	n/f	n/f			

Symptom description was registered in scion (sci, bold) and interstock (int, italic) of each plant at 14, 28, and 55 days post-inoculation (dpi). The three groups of triple plants with ihpCP-10, ihpCP-15 and non-tg interstocks are separated. Symptom abbreviations: Sp = spots; V = variegation; F = flecking; S = shock; H = healthy (asymptomatic); n/f = no foliage. Severity: + = mild; ++ = moderate; +++ = severe. Highlighted samples (bolditalic) correspond to the symptoms shown in pictures of Fig. 3. Each symptom status was quantified with a score (in parenthesis). Scores were calculated for interstocks and scions divided by the total of individuals per group of triple plants. Ratios were plotted in Fig. 4a

were obtained with the ihpCP-15 triple plants. In ihpCP-10 plants the same behavior was observed (data not shown). Northern blot analysis showed a clear

difference between infected and non-infected non-tg interstock (left panel) and non-tg scion (right panel), having no siRNA accumulation before inoculation,

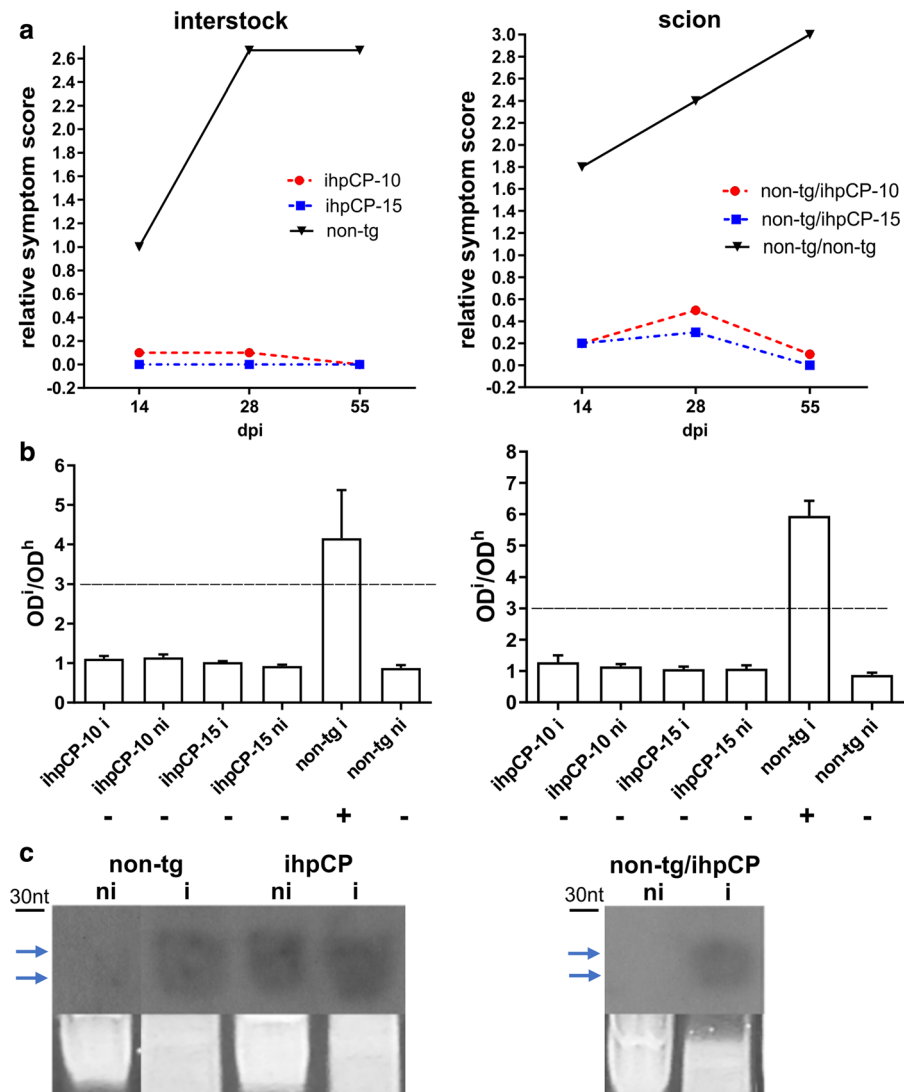


**Fig. 3** Psorosis symptom displayed by the triple plants challenged with CPsV 90-1-1 in the interstock. Different tissues of triple plants at 28 days post-inoculation (dpi). **a** Faint spots in ihpCP-10 tissue (Sp+, score 1). **b** Faint spot and variegation in non-tg scion on ihpCP-10 interstock (Sp+, V+, score 2). **c** Faint spots in non-tg scion on ihpCP-15 tissue (Sp+, score 1). **d** Faint spots and mild flecking in non-tg scion on ihpCP-15 (Sp+, F+, score 2). **e** Moderate spots and mild variegation in non-tg tissue (Sp++, V+, score 3). **f** Severe shock in non-tg tissue (S+++, score 6). **g, h** Moderate spots and severe flecking in non-tg tissue (Sp++, F+++, score 5)

but high level of the siRNA after CPsV infection, likely produced by virus-induced gene silencing in infected non-tg control. Moreover, similar band intensity was observed in the ihpCP interstocks before and after inoculation (left panel), suggesting no siRNA contribution from VIGS, with very low or no virus multiplication in the inoculated ihpCP interstock. These results indicate that the ihpCP interstock probably controls the infection at early stages, impeding CPsV detection and symptom expression.

Triple plants show lower tolerance to CPsV but fast recovery when inoculated in the non-tg scion

Given the strong tolerance response found in both, resistant interstock and non-tg scion when triple plants are graft-inoculated with CPsV in the interstock, we wondered about the behavior of these plants when they are inoculated in the non-tg scion. To that effect, 12 replicates of each triple plants were prepared: with ihpCP-10, ihpCP-15, or non-tg interstock; all of them with a non-tg Sweet Orange scion. The challenge was performed by CPsV-grafting in the non-transgenic scion in 10 replicates per group, and two individuals remained as non-infected controls. The plants were analyzed at 31 and 71 dpi in young leaves after pruning. The psorosis symptoms observed in each plant are detailed in Table 3. Symptom scores and virus accumulation were determined mainly on scions (Fig. 5), since most of the interstocks did not develop foliage in this experiment (see Table 3). Figure 5a shows that at 31 dpi all the groups exhibited high relative symptom scores (6.0, 4.9 and 5.25 for scions onto ihpCP-10, -15 and non-tg, respectively), with CPsV infection confirmed by RT-PCR. However, at 71 dpi, both groups of scions grafted onto ihpCP interstocks had a significant drop in symptom expression score (1.8 for triple ihpCP-15 plants and 2.2 for triple ihpCP-10) compared with the score of non-tg control (5.0). Except for one plant, at 71 dpi (second flush), all scions of the triple ihpCP plants showed less viral titer than the non-tg controls correlating with the symptom scores. Triple plants were analyzed as groups by pairwise Tukey's test with  $p$  value  $< 0.05$ , and the average of relative copy numbers of scions onto ihpCP interstocks was significantly lower than the ones grafted onto non-tg (Fig. 5b). Non-inoculated controls remained asymptomatic and negative for CPsV detection during the entire period. The results suggested that CPsV infection was controlled in triple ihpCP plants with respect to non-tg controls at the second flush, indicating that the signal generated in the interstock and translocated to the scion likely contributed to psorosis protection, by triggering recovery in the non-tg scion.



**Fig. 4** Analysis of triple plants inoculated with CPsV 90-1-1 in the interstock. Left panels: interstocks. Right panels: non-tg scions of the triple plants. **a** Psoriasis symptom evaluation versus time. Relative symptom score was calculated as indicated in Table 2, in triple plants with transgenic ihpCP-10 (red) and -15 lines (blue) and non-tg interstock (black), at three successive times: 14-, 28- and 55-days post-inoculation (dpi). **b** CPsV detection in CPsV-inoculated (i), and non-inoculated tissue (ni) at 55 dpi. Quantitative detection of CPsV CP protein by TAS-ELISA.  $OD^i/OD^h$  represents the average value of OD at 492 nm of individuals in technical triplicates ( $OD^i$ ), divided by the average healthy control ( $OD^h$ ). The dotted line indicates the cut-

off point ( $OD^i/OD^h = 3$ ). Standard error is indicated on top of each bar. Bottom panel indicates RT-PCR results: positive (+) or negative (-) for CPsV RNA1, RNA2, and RNA3 (outside the hairpin). **c** siRNA-ihpCP accumulation in triple plants at 55dpi determined by Northern blot using a  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-UTP labeled ihpCP-derived oligonucleotides as probes. Ethidium bromide-stained rRNA is shown as a loading control. DNA oligonucleotide of 30 nt was used as molecular weight marker. Bands of ihpCP-siRNA are indicated by arrows. Sample order: non-tg interstock non-inoculated (ni) and CPsV-inoculated (i), ihpCP interstock (line 15) ni and i (left panel); and non-tg scion onto ihpCP interstock ni and i (right panel). (Color figure online)

## Discussion

We have previously shown that lines ihpCP-10 and -15 resulted in high level of CPsV resistance (Reyes

et al. 2011; De Francesco et al. 2017). In this work we have assayed these lines to test their resistance when used as interstock of a triple plant, with non-tg rootstock and scion. The ihpCP-10 and -15 interstocks

**Table 3** Symptom scores in triple plants challenged by CPsV in the scion

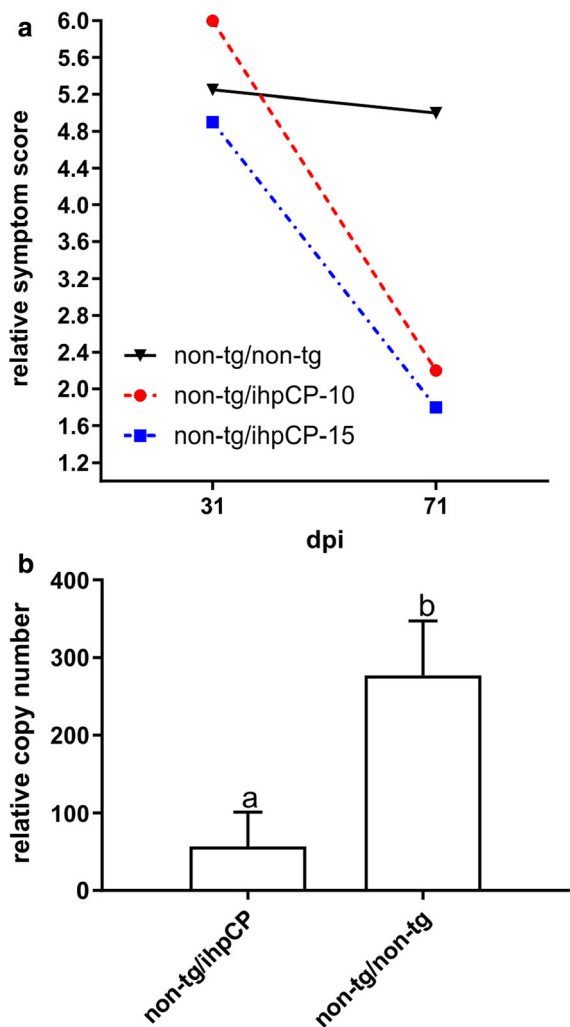
Plant #/ dpi	ihpCP-10		ihpCP-15		non-tg	
	31	71	31	71	31	71
1						
<b>sci</b>	H (0)	H (0)	S+ Sp+ (4)	H (0)	Sp+ S++ (6)	Sp++ S+ (6)
<i>int</i>	n/f	n/f	n/f	n/f	Sp+ (1)	Sp+ (1)
2						
<b>sci</b>	Sp++ (2)	H (0)	S++ Sp+ (6)	S+ Sp++ (6)	Sp+++ F+++ S+++ (12)	Sp+++ S+++ (9)
<i>int</i>	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f2
3						
<b>sci</b>	S++ Sp++ (7)	H (0)	S+ Sp+++ (7)	Sp+++ (3)	n/f	n/f
<i>int</i>	n/f	H (0)	n/f	n/f	n/f	n/f
4						
<b>sci</b>	n/f	H (0)	S+ Sp++ (6)	Sp+ (1)	S+ Sp+++ (7)	S+ Sp+++ (7)
<i>int</i>	n/f	H (0)	n/f	n/f	n/f	n/f
5						
<b>sci</b>	S+ F++ Sp+++ (9)	Sp++ (2)	S++ Sp+++ (8)	Sp++ (2)	S+++ Sp+++ (9)	F+ (1)
<i>int</i>	Sp+ (1)	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f
6						
<b>sci</b>	S+ Sp+++ (7)	Sp++ (2)	H (0)	H (0)	H (0)	n/f
<i>int</i>	F++ (2)	H (0)	n/f	H (0)	n/f	n/f
7						
<b>sci</b>	S+ F++ Sp++ (8)	S+ Sp+++ (7)	S+ Sp++ (6)	F++ Sp++ (4)	S++ Sp+++ (8)	Sp++ (2)
<i>int</i>	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f
8						
<b>sci</b>	S+ Sp+++ (7)	F++ (2)	S+ Sp++ (6)	H (0)	H (0)	n/f
<i>int</i>	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f
9						
<b>sci</b>	S+ Sp+ (5)	Sp++ (2)	S++ (5)	H (0)	H (0)	n/f
<i>int</i>	n/f	n/f	n/f	H (0)	n/f	n/f
10						
<b>sci</b>	S+++ Sp+++ (9)	S+ Sp+++ (7)	Sp+ (1)	Sp++ (2)	n/f	n/f
<i>int</i>	H (0)	n/f	n/f	n/f	n/f	n/f

Symptom description was recorded in scion (*sci*, bold) and interstock (*int*, italic) of each plant at 31 and 71dpi. The three groups of triple plants with ihpCP-10, ihpCP-15 and non-tg interstocks are separated. Symptom abbreviations: Sp = spots; V = variegation; F = flecking; S = shock; H = healthy (asymptomatic); n/f = no foliage. Severity: + = mild; ++ = moderate; +++ = severe. Scores are indicated in brackets. Score were calculated for each group of scions and divided by the total of individuals per group. Ratios were plotted in Fig. 5

were resistant, which supports the idea that vegetative propagation of these lines conserved the capacity of protection against CPsV since the generation of the ihpCP mother plants more than 10 years ago. We also found that these transgenic interstocks were able to

protect the non-tg scion when graft-inoculation was done in the interstock.

We analysed silencing status in bark tissue from citrus branches, which are mostly constituted by vasculature, indicating that ihpCP-siRNA and



**Fig. 5** Analysis of triple plants when challenged with CPsV 90-1-1 in the non-tg scion. **a** Psorosis symptom evaluation versus time in the non-tg scions grafted onto ihpCP interstocks, or onto non-tg controls, expressed as relative symptom score calculated as indicated in Table 3, in triple plants with transgenic ihpCP-10 (red) and -15 lines (blue) and non-tg interstock (black), observed at 31 and 71 days post-inoculation (dpi). **b** CPsV molecular detection in scions of triple plants CPsV-inoculated (i), and non-inoculated (ni) at 71 dpi determined by RT-qPCR with primers outside the hairpin and expressed as relative copy number (CP copies by 100 copies of ubiquitin), in non-tg scions onto ihpCP-10, ihpCP-15 and non-tg interstocks, respectively. Each individual was tested, and the copy number was averaged whitening each group. The upper bars indicate the standard error. A pairwise Tukey's test was performed with  $p$  value  $< 0.05$  (upper letters a and b). (Color figure online)

ihpCP-transcript could be synthesized in the vascular tissue and/or is mobilized systemically from the

transgenic leaves (source) to the non-tg tissue (sink). In *Arabidopsis thaliana*, Molnar et al. (2010) described that siRNA were three orders of magnitude less abundant in the recipient tissue than in the source tissue. We have found that increasing the distance from the interstock leaves (source of ihpCP-transcript), there is a decrease of 2 and 3 orders of magnitude in ihpCP-transcript abundance, indicating it is moving and diluted through the tissues. Based on studies with non-cell autonomous small RNAs, Dunoyer et al. (2010) supported the hypothesis of siRNAs as signal, but also mentioned that transcript translocation could not be discarded. Transport of functional mRNAs from one tissue to another and through the graft has been described in several systems (Kehr and Buhtz 2008; Stegemann and Bock 2009; Spiegelman et al. 2013). Since ihpCP-transcript detection has been performed by amplification of a 113 bp-fragment, which is shorter than the whole transcript, we cannot confirm which one is transported: the ihpCP-transcript or its smaller products processed into siRNAs, which translocate and trigger silencing in distal target cells.

Dalakouras et al. (2011) found that insertion of the hairpin in a different locus has changed the processing and resulting silencing. In our work, ihpCP-15 line provided stronger protection than ihpCP-10 line as interstock, with consistently lower symptom severity and higher recovery rate, confirming the higher performance of ihpCP-15 line previously reported (Reyes et al. 2011; De Francesco et al. 2017). However, no correlation between ihpCP-siRNA/transcript level and resistance could be established. In this work we also analyzed and compared the ihpCP-transcript expression level in both lines as interstock, and again no significant difference was found between them.

We demonstrated that ihpCP transcript or its processing products could translocate through the scion and induce silencing of the CP-target, which led to the hypothesis that the ihpCP-interstock may protect an inoculated non-tg scion. However, when the infection was initiated in the non-tg scion, the interstock did not protect the scion at the beginning of the infection (first flush, 31 dpi). Graft-inoculum was selected for high virus accumulation to ensure infection, which may upload much more virus CP mRNA than the CP mRNA expressed in the CP-18 line (Zanek et al. 2008). Thus, it is likely that the protection

conferred by ihpCP interstocks can be overwhelmed by a high viral load grafted on the non-tg scion, although not for the tg interstock, which is highly resistant. In this sense, thinking that one of the candidates for CPsV transmission is *Olpidium* spp., a soil-borne vector (Moreno et al. 2015), and considering that this vector could load much less amount of virus than a graft-inoculation, we can hypothesize that virus multiplication or its dissemination in the scion would be controlled by a ihpCP rootstock.

Plants develop mechanisms of innate immunity against virus, such as recovery, seen when plants can control disease development after systemic virus infection, and stop or diminish symptom expression in young leaves (MacDiarmid 2005; Jovel et al. 2007). This phenomenon is explained as an antiviral defense mechanism, also based on silencing (Li and Ding 2006; Ma et al. 2015). Across both trials in this work, scions of ihpCP triple plants challenged in the ihpCP interstock (Fig. 4) or directly in the scion (Fig. 5) manifested recovery, while non-tg controls developed severe symptoms along the entire evaluation period, indicating that transgenic protection includes recovery. The protection was higher when the inoculation was performed in the transgenic tissues (interstock) than in the non-tg scions, suggesting that the success of the resistance is subject to the silencing level: if the virus infects a transgenic tissue, with the silencing already established, the infection is easily blocked. However, if infection happens in a non-tg tissue, the infection overcomes the defence mechanism. Then, pre-activation of the RNA-silencing machinery along with a minimum accumulation of siRNA molecules targeting viral RNAs prior to virus exposure on non-tg tissue, is likely the key factor for virus resistance. Viral load and mechanism of delivery are also critical considerations in challenging ihpCP plants.

We did not include data from the non-tg Rough Lemon rootstocks, since those tissues constituted the main trunk of the plants, and thus developed few leaves in some occasions or no foliage at all. In those few samples, we observed complete absence of symptom expression and CPsV detection was negative in rootstocks when the inoculation was performed in the interstock (data not shown). This suggests that the protection provided by the ihpCP-interstock was conferred to both, scion and rootstock of triple plants, and means that resistance could be transmitted bidirectionally by grafting in these triple plants.

**Acknowledgements** We thank Fabián Ramos (EEA-Concordia) and Claudio Mazo (IBBM-UNLP) for plant maintenance in the greenhouses, and Dr. Alex Blacutt (UC Riverside) for English revision on the manuscript. This work was supported by Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT) PICT 2014-1007, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) Proyectos de Investigación de Unidades Ejecutoras – (IBBM), Universidad Nacional de La Plata (UNLP) X-692, and Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (PNFRU-1172; 11721; ERIOS-630081).

## References

- Anderson C (2000) Presentation on the Argentinean certification program. In: Proceedings of global citrus germplasm network, 7–8 Dec 2000
- Dalakouras A, Tzanopoulou M, Tsagris M, Wassenegger M, Kalantidis K (2011) Hairpin transcription does not necessarily lead to efficient triggering of the RNAi pathway. *Transgenic Res* 20(2):293–304. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9416-3>
- De Francesco A, Costa N, Plata MI, García ML (2015) Improved detection of citrus psorosis virus and coat protein-derived transgenes in citrus plants: comparison between RT-qPCR and TAS-ELISA. *J Phytopathol* 163:915–925. <https://doi.org/10.1111/jph.12392>
- De Francesco A, Costa N, García ML (2017) Citrus psorosis virus coat protein-derived hairpin construct confers stable transgenic resistance in citrus against psorosis A and B syndromes. *Transgenic Res* 26:225–235. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-0001-2>
- Dunoyer P, Schott G, Himer C, Meyer D, Takeda A, Carington JC et al (2010) Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328(5980):912–916. <https://doi.org/10.1126/science.1185880>
- Fire A (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* 15:358–363. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(99\)01818-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(99)01818-1)
- García ML, Dal Bo E, Grau O, Milne RG (1994) The closely related citrus ringspot and citrus psorosis viruses have particles of novel filamentous morphology. *J Gen Virol* 75:3585–3590. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-12-3585>
- García ML, Dal Bo E, Da Graça JV, Gago-Zachert S, Hammond J, Moreno P et al (2017) Rename the family ophioviridae and its constituent species. <http://doi.org/10.13140/RG.2.2.29947.21282>
- Guo O, Liu Q, Smith NA, Liang G, Wang M (2016) RNA silencing in plants: mechanisms, technologies and applications in horticultural crops. *Curr Genom* 17:476–489. <https://doi.org/10.2174/1389202917666160520103117>
- Helliwell C, Waterhouse P (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30(4):289–295. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00036-7](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00036-7)
- Jovel J, Walker M, Sanfaçon H (2007) Recovery of nicotiana benthamiana plants from a necrotic response induced by a

- nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *J Virol* 81(22):12285–12297. <https://doi.org/10.1128/JVI.01192-07>
- Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M, Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15(8):826–833. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.8.826>
- Kamthan A, Chaudhuri A, Kamthan M, Datta A (2015) Small RNAs in plants: recent development and application for crop improvement. *Front Plant Sci* 6:208. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00208>
- Kehr J, Buhtz A (2008) Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* 59(1):85–92. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm176>
- Li F, Ding SW (2006) Virus counterdefense: diverse strategies for evading the RNA silencing immunity. *Annu Rev Microbiol* 60:503–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.60.080805.142205>
- Ma X, Nicole MC, Meteignier LV, Hong N, Wang G, Moffett P (2015) Different roles for RNA silencing and RNA processing components in virus recovery and virus-induced gene silencing in plants. *J Exp Bot* 66(3):919–932. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru447>
- MacDiarmid R (2005) RNA silencing in productive virus infections. *Annu Rev Phytopathol* 43:523–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140204>
- Milne RG, García ML, Grau O (2000) Genus Ophiovirus. In: van Regenmortel MVH, Fauquet CM, Bishop DHL, Carstens EB, Estes MK, Lemon SM, Maniloff J, Mayo MA, Mc Geoch DJ, Pringle CR, Wickner RB (eds) *Virus taxonomy*. Seventh report of the international committee on taxonomy of virus. Academic Press, New York, pp 627–631
- Molnar A, Melnyk CW, Bassett A, Hardcastle TJ, Dunn R, Baulcombe DC (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328(5980):872–875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Moreno P, Guerri J, García ML (2015) The psorosis disease of citrus: a pale light at the end of the tunnel. *J Cit Pathol* 2:1–18. <https://escholarship.org/uc/item/0tm7m65m>
- Naum-Ongania G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O, García ML (2003) Citrus psorosis virus RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes in its complementary strand a 24 K protein of unknown function and 280 K putative RNA dependent RNA polymerase. *Virus Res* 96:49–61. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00172-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00172-2)
- Pall GS, Hamilton AJ (2008) Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nat Protoc* 3:1077–1084. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.67>
- Reyes CA, De Francesco A, Peña EJ, Costa N, Plata MI, Sendin L, Castagnaro AP, García ML (2011) Resistance to Citrus psorosis virus in transgenic sweet orange plants is triggered by coat protein–RNA silencing. *J Biotechnol* 151:151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.11.007>
- Reyes CA, Ocolotobiche EE, Marmisollé FE, Robles Luna G, Borniego MB, Bazzini AA, Asurmendi S, García ML (2015) Citrus psorosis virus 24 K protein interacts with citrus miRNA precursors, affects their processing and subsequent miRNA accumulation and target expression. *Mol Plant Pathol* 17(3):317–329. <https://doi.org/10.1111/mpp.12282>
- Reyes CA, De Francesco A, Ocolotobiche EE, Costa N, García ML (2016) Uncontrolled Citrus psorosis virus infection in Citrus sinensis transgenic plants expressing a viral 24 K derived hairpin that does not trigger RNA silencing. *Physiol Mol Plant Pathol* 94:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2016.05.001>
- Robles Luna G, Peña EJ, Borniego MB, Heinlein M, García ML (2013) Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. *Virology* 441:152–161. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2013.03.019>
- Robles Luna G, Reyes CA, Peña EJ, Ocolotobiche E, Baeza C, Borniego MB, Kormelink R, García ML (2017) Identification and characterization of two RNA silencing suppressors encoded by ophioviruses. *Virus Res* 235:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.04.013>
- Roistacher CN (1991) Psorosis complex: psorosis-A, psorosis-B and ringspot. In: International Organization of Citrus Virologists (ed) *Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp 115–126
- Sánchez de la Torre ME, Riva O, Zandomeni R, Grau O, García ML (1998) The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Mol Plant Pathol* 25:261–276
- Smith NA, Singh SP, Wang MB, Stoutjesdijk PA, Green AG, Waterhouse PM (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407:319–320. <https://doi.org/10.1038/35030305>
- Spiegelman Z, Golan G, Wolf S (2013) Don't kill the messenger: long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci* 213:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.08.011>
- Stegemann S, Bock R (2009) Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science* 324(5927):649–651. <https://doi.org/10.1126/science.1170397>
- Yousif Gaffar F, Koch A (2019) Catch me if you can! RNA Silencing-based improvement of antiviral plant immunity. *Viruses* 11:673. <https://doi.org/10.3390/v11070673>
- Zanek MC, Peña E, Reyes CA, Figueroa J, Stein B, Grau O (2006) Detection of Citrus psorosis virus in the northwestern citrus production area of Argentina by using an improved TAS-ELISA. *J Virol Methods* 137:245–251. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.06.021>
- Zanek MC, Reyes CA, Cervera M, Peña EJ, Velazquez K, Costa N, Plata MI, Grau O, Peña L, García ML (2008) Genetic transformation of sweet orange with the coat protein gene of Citrus psorosis virus and evaluation of resistance against the virus. *Plant Cell Rep* 27:57–66. <https://doi.org/10.1007/s00299-007-0422-8>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.