



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

**Caracterización de un aislado RB
(*resistance breaking*) de *Citrus tristeza
virus* y su efecto sobre *Poncirus
trifoliata***

Leticia Rubio Cattani

Doctorado en Ciencias Agrarias

Julio, 2025

**Caracterización de un aislado RB
(*resistance breaking*) de *Citrus tristeza
virus* y su efecto sobre *Poncirus
trifoliata***

Leticia Rubio Cattani

Doctorado en Ciencias Agrarias

Julio, 2025

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Lic. Biol. (Dra.) Inés Ponce de León, Lic. Biol. (Dra.) Mari Carmen Vives y la Lic. Bioq. (Dra.) Lochy Batista el 9 de setiembre de 2025. Autora: Ing. Agr. Msc. Leticia Rubio. Director: Dr. Ing. Agr. Fernando Rivas. Codirector: Dr. Rodney Colina.

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna manera, hicieron posible la realización de este trabajo. De forma especial agradezco a:

— Fernando Rivas, quien avaló y apoyó desde el Programa de Citricultura esta línea de trabajo y dirigió la tesis, apostando a mi formación en distintas temáticas.

— Diego Maeso, por introducirme en esta linda línea de trabajo con los virus vegetales, por todas sus sugerencias y enseñanzas.

— Ana Bertalmío y Roque Rolón, por enseñarme todo lo referente a los testajes biológicos y estar siempre a disposición para lo que necesitara.

— Lester Hernández, por su orientación y acompañamiento en las primeras etapas del trabajo y sus valiosas sugerencias.

— Rodney Colina, por su orientación en los trabajos moleculares.

— Ana Arruabarrena, por poner a disposición su laboratorio, por orientarme en los ajustes de las técnicas y por su contribución en el procesamiento y análisis de datos.

— Matías Salvo, por su colaboración en la puesta a punto de protocolos y en el análisis de los resultados moleculares.

— Matías Castells y Silvia Garaycochea, por colaborar con el procesamiento de datos moleculares.

— Álvaro Otero y Delia Machado, quienes me capacitaron en distintas técnicas de fisiología vegetal, pusieron a disposición sus equipos y laboratorio y colaboraron en la interpretación y análisis de los resultados.

— A los compañeros de protección vegetal: Juan Amaral, Andrea Guimaraens, Mauricio Sbres y Oribe Blanco, por su invalorable colaboración en las diferentes etapas del trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Página de aprobación	III
<u>Agradecimientos</u>	IV
<u>Resumen</u>	VIII
<u>Summary</u>	IX
<u>1. Introducción</u>	1
<u>2. Marco teórico</u>	3
2.1. El cultivo de cítricos	3
<u>2.1.1. El cultivo de cítricos en Uruguay</u>	4
<u>2.1.2. Limitantes productivas de los cítricos</u>	4
2.2. La tristeza de los cítricos	5
<u>2.2.1 Agente causal: <i>Citrus tristeza virus</i> (CTV)</u>	6
<u>2.2.2. Síntomas</u>	6
<u>2.2.3. Hospederos</u>	9
<u>2.2.4. Transmisión de CTV</u>	9
<u>2.2.5. Aislados de CTV</u>	10
2.2.5.1. El genotipo RB de citrus tristeza virus	10
2.3. CTV y el genotipo RB en Uruguay	11
2.4. Interacción planta-patógeno	13
<u>2.4.1. Consecuencias de la infección viral para la planta</u>	14
2.4.1.1 Efectos en la fotosíntesis.....	14
2.4.1.2. Estrés oxidativo	15
2.4.1.3. Efectos sobre el crecimiento de la planta.....	16
2.4.1.4. Mecanismos de defensa de la planta.....	16
<u>2.4.2. Infección con CTV y efectos sobre la fisiología de los cítricos</u>	17
<u>3. Hipótesis y objetivos</u>	19
3.1. Hipótesis	19
3.2. Objetivo general	19

3.3. Objetivos específicos	19
<u>4. Biological and molecular characterization of a resistance-breaking isolate of <i>Citrus tristeza virus</i> from Uruguay and its effects on <i>Poncirus trifoliata</i> growth performance*</u>	20
4.2 Summary	21
4.3. Introduction	22
4.4. Materials and methods	23
<u>4.4.1. CTV isolates</u>	23
<u>4.4.2. Molecular characterization of the RB-UY1 isolate</u>	24
4.4.2.1. RNA extraction, cDNA synthesis, and sequencing	24
4.4.2.2. Phylogenetic analysis.....	26
4.4.2.3. Sequence comparisons	26
4.4.2.4. Recombination analysis	26
<u>4.4.3. Biological characterization of RB-UY1</u>	27
4.4.3.1. Biological characterization of RB-UY1 on indicator plants	27
4.4.3.2. Effect of RB-UY1 on the biological performance of <i>P. trifoliata</i>	27
4.4.3.3. Efficiency of transmission of RB-UY1 by <i>T. citricida</i>	27
4.5. Results	28
<u>4.5.1. Molecular characterization</u>	28
<u>4.5.2. Biological characterization of RB-UY1</u>	31
4.5.2.1 Biological characterization of RB-UY1 on indicator plants	31
4.5.2.2. Effect of RB-UY1 on the biological performance of <i>P. trifoliata</i>	33
4.5.2.3. Efficiency of transmission of RB-UY1 by <i>T. citricida</i>	34
4.6. Discussion	35
4.7. References	37
<u>5. Physiological response of <i>Poncirus trifoliata</i> rootstock to infection by an RB isolate of <i>Citrus tristeza virus</i>*</u>	43
5.1. Resumen	43
5.2. Summary	44

5.3. Introduction	45
5.4. Materials and methods	46
<u>5.4.1. Virus isolate, plant material and experimental conditions</u>	46
<u>5.4.2. Plant growth parameters and CTV symptoms</u>	47
<u>5.4.3. Chlorophyll fluorescence parameters</u>	47
<u>5.4.4. Chlorophyll index</u>	48
<u>5.4.5. Gas exchange parameters</u>	48
<u>5.4.6. Determination of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide and superoxide radicals in plant tissues</u>	48
<u>5.4.7 Determination of total phenol content and enzyme activity</u>	49
<u>5.4.8. Statistical analysis</u>	50
5.5. Results	50
<u>5.1.1. Plant growth and CTV symptoms</u>	50
<u>5.5.2. Chlorophyll fluorescence parameters</u>	52
<u>5.5.3. Chlorophyll index</u>	52
<u>5.5.4. Gas exchange parameters</u>	53
<u>5.5.5. Oxidative damage and ROS in plant tissues</u>	54
<u>5.5.6. Total phenol content and ROS scavenging enzymes</u>	56
5.6. Discussion	57
5.7. References	61
<u>6. Discusión general</u>	67
<u>7. Conclusiones</u>	70
<u>8. Bibliografía</u>	71

Resumen

Poncirus trifoliata es el portainjerto de cítricos más utilizado en Uruguay; una de sus principales cualidades es la resistencia al declinamiento por *Citrus tristeza virus* (CTV). No obstante, en las últimas décadas se han identificado aislados capaces de quebrar esa resistencia, denominados *RB* (*resistance breaking*). Estos aislados han sido reportados recientemente en Uruguay, lo que plantea un nuevo desafío para la sostenibilidad del sistema productivo. El objetivo de esta tesis fue caracterizar un aislado RB local (denominado RB-UY1) de CTV, mediante la evaluación de sus características biológicas y genéticas, su eficiencia de transmisión y la respuesta fisiológica que induce en *P. trifoliata* y variedades injertadas, utilizando como modelos naranja navel (*Citrus sinensis* cv. Navel, N/*P. trifoliata*) y lima Mexicana (*Citrus aurantifolia*, ML/*P. trifoliata*). Los resultados demostraron que el aislado RB-UY1 es un recombinante RB-T3, perteneciente al subclado RB1, y fue transmitido eficientemente por el áfido *Toxoptera citricida*. Los bioensayos lo clasificaron como un aislado suave de CTV, ya que solo indujo síntomas de aclaramiento de nervaduras y hoja de cuchara en lima Mexicana. Sin embargo, se observó *stem pitting* suave a moderado en tallos de *P. trifoliata*, síntoma asociado a la pérdida de vigor y productividad. Desde el punto de vista fisiológico, la infección, no afectó la actividad fotosintética ni provocó daño oxidativo evidente, a pesar de detectar mayores niveles de radicales H_2O_2 y O_2^- en tejidos de plantas inoculadas. Se registró, una reducción significativa de crecimiento en *P. trifoliata* y ML/*P. trifoliata*, pero no en N/*P. trifoliata*. Además, la infección indujo un aumento significativo en el contenido total de fenoles en el portainjerto y N/*P. trifoliata*, sin cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y APX. En conclusión, el aislado RB-UY1 afectó, a largo plazo, el crecimiento de *P. trifoliata*, aunque no comprometió el desempeño fisiológico de N/*P. trifoliata*. Estos resultados evidencian una interacción específica entre huésped y aislado viral, comprender los mecanismos involucrados en ella es esencial para el desarrollar estrategias de manejo efectivas para aislados RB de CTV.

Palabras clave: aislados RB, CTV, interacción huésped-patógeno, *Poncirus trifoliata*

Characterization of an RB (resistance breaking) isolate of *Citrus tristeza virus*
and its effect on *Poncirus trifoliata*

Summary

Poncirus trifoliata is the main citrus rootstock in Uruguay and one of its attributes is its resistance to decline by *Citrus tristeza virus* (CTV). However, in recent decades, isolates capable of overcoming this resistance known as resistance breaking (RB) strains have been identified, and were recently reported in Uruguay, posing a new challenge to production systems. The aim of this work was to characterize a local RB isolate (designated RB-UY1), by evaluating its biological and genetic features, transmission efficiency, and the physiological response of *P. trifoliata* and grafted scion to its infection, using navel orange (*Citrus sinensis* cv. Navel, N/*P. trifoliata*) and Mexican lime (*Citrus aurantifolia*, ML/*P. trifoliata*) as models. Results showed that RB-UY1 isolate is a RB-T3 recombinant and belongs to the RB1 subclade, and it was efficiently transmitted by the aphid *Toxoptera citricida*. According to bioassay, RB-UY1 was classified as a mild CTV isolate, as it only induced vein clearing and leaf cupping in Mexican lime. However, mild to moderate stem pitting was observed on *P. trifoliata* stems, a symptom associated with reduced vigor and yield. Regarding the physiological response to infection, no impairment of photosynthetic activity or oxidative damage was detected, despite increased levels of H₂O₂ y O₂⁻ radicals detected in inoculated plants. A significant reduction in growth was observed in *P. trifoliata* and ML/*P. trifoliata*, but not in N/*P. trifoliata*. Additionally, the infection induced a significant increase in total phenolic content in *P. trifoliata* and N/*P. trifoliata*, without changes in the activity of antioxidant enzymes CAT and APX. In conclusion, infection with the RB-UY1 isolate affected the long-term growth of *P. trifoliata* but did not compromise the N/*P. trifoliata* physiological performance. The results reveal a specific interaction between the host and the viral isolate, so understanding the mechanisms involved is essential to developing effective management strategies for RB-CTV isolates.

Keywords: RB isolates, CTV, host-pathogen interaction, *Poncirus trifoliata*.

1. Introducción

La tristeza ha sido una de las enfermedades más devastadoras de la citricultura mundial. Es causada por un virus que se aloja fundamentalmente en el floema, denominado *Citrus tristeza virus* (CTV) (Moreno et al., 2008; Roistacher et al., 2010). Este patógeno provoca dos síntomas de importancia productiva: el declinamiento de las especies cítricas afectadas cuando están injertadas sobre el portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) y *stem pitting* (acanaladuras en la madera), el cual disminuye el potencial productivo de la planta (Dawson et al., 2013). En nuestro país, el virus provocó la muerte de miles de plantas en plena producción a mediados del siglo XX y obligó a la sustitución del naranjo agrio por portainjertos trifoliados resistentes a tristeza. Actualmente, más del 90 % de la citricultura local utiliza *Poncirus trifoliata* o sus híbridos como medida de manejo para CTV, por lo que el síntoma de declinamiento está ausente. No obstante, el control de la enfermedad aún no está resuelto. CTV y su vector son endémicos (Benítez Galeano et al., 2019; Bentancour et al., 2009) y los portainjertos trifoliados no previenen la aparición de *acanaladuras en la madera* (Cook, 2019; Folimonova et al., 2020). Además, reportes actuales dan cuenta de importantes pérdidas de productividad en pomelos y variedades de naranjo dulce en Sudáfrica y México a causa de síntomas severos de *stem pitting* (Cook, 2019; Rivas-Valencia et al., 2020). En Uruguay, desde el 2014, las plantas cítricas que se comercializan son producidas a través del Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Citrus y se encuentran libres de CTV (Bertalmío et al., 2012). Sin embargo, la enfermedad se transmite eficientemente por pulgones en condiciones de campo (Rocha Peña et al., 1995) y es esperable que las plantas saneadas sean infectadas a los pocos años de ser instaladas en el campo (Gottwald et al., 1996). A modo de mitigar el efecto que tendría la infección de plantas sanas con variantes severas del virus, desde el año 2012, se han desarrollado distintas líneas de trabajo en busca de una estrategia de manejo integrado para CTV. Estos estudios confirmaron una alta incidencia de CTV en campo, el predominio de variantes severas y una considerable diversidad genética (Benítez-Galeano et al., 2021; Rubio et al., 2018).

Citrus tristeza virus se caracteriza por exhibir una notable variabilidad genética e inducir diversas reacciones biológicas en sus hospederos. En este sentido, se han reportado al menos once grupos genéticos (Dawson et al., 2015; Harper, 2013; Yokomi et al., 2018; Bester et al., 2021), de ellos el genotipo RB es el único que logra multiplicarse e infectar sistémicamente a *P. trifoliata* (Yokomi et al., 2017). Nuestros relevamientos de CTV en campo identificaron, aunque en baja frecuencia, aislados con secuencias parciales correspondientes a este genotipo (Rubio et al., 2018), un hallazgo relevante considerando la situación epidemiológica del virus en el país y el uso extendido de *P. trifoliata* como portainjerto. Trabajos posteriores, de segregación de aislados de CTV mediante el uso de áfidos, nos permitieron obtener un aislado con tres regiones genéticas pertenecientes al genotipo RB. Este aislado fue inoculado en *P. trifoliata*, su infección fue confirmada por técnicas moleculares, y se lo reportó como el primer aislado RB en el país (Hernández-Rodríguez et al., 2017). Posteriormente, mediante estudios moleculares se identificó otro aislado de estas características (Benítez-Galeano et al., 2018).

Si bien este genotipo ha sido reportado en varias regiones citrícolas del mundo (Roy et al., 2013; Scott et al., 2013; Yokomi et al., 2017), no hay información consistente sobre los perjuicios fisiológico-productivos que podría ocasionar esta variante del virus al portainjerto.

Dada la importancia de *P. trifoliata* para la citricultura nacional, este trabajo se centró en el estudio de las características biológicas y genéticas de un aislado RB local, con el objetivo de determinar su severidad, eficiencia de transmisión e impacto sobre la fisiología de la planta, y, finalmente, discutir su implicancia productiva para la citricultura.

2. Marco teórico

2.1. El cultivo de cítricos

El término *cítricos* hace referencia al conjunto de especies e híbridos pertenecientes a los géneros *Citrus*, *Fortunella* y *Poncirus* de la familia Rutaceae. Son especies perennes (excepto *Poncirus*, que son de hoja caduca), cuyos frutos son hesperidios de 3 cm a 10 cm de longitud, muy importantes en la dieta humana por su alto contenido de antioxidantes y vitamina C. Son especies originarias del sudeste asiático, pero hoy están ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales, entre la latitud 40° N y 40° S. Su cultivo requiere una amplitud térmica entre 23 °C y 34 °C, precipitaciones de 1000 mm a 1300 mm anuales y suelos profundos, bien drenados, arenosos o de texturas medias y ligeramente ácidos (Agustí et al., 2014; Davies y Albrigo, 1994).

En el mundo se cultivan 12,7 millones de hectáreas, con una producción aproximada de 158,5 millones de toneladas por año, constituyendo uno de los frutales más importantes en el mundo (Citrus World Statistics, 2022). Los principales países productores son China, Brasil, India y México. Las especies cítricas cultivadas se concentran en cuatro grupos: a) naranjos dulces (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y agrios (*Citrus aurantium* L.); b) mandarinas (*Citrus reticulata*); c) limones (*Citrus limon* (L.) Burm. f.) y limas (*Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing); y d) pomelos (*Citrus paradisi* Macf.). Estos grupos nuclea un alto número de variedades, con escasa variabilidad genética entre ellas (Agustí, 2003; Agustí et al., 2014).

Los cítricos comerciales se propagan mediante la técnica de injerto, en la cual yemas de la variedad seleccionada son injertadas sobre un portainjerto obtenido de semilla (Ollitrault y Navarro, 2012). Esta técnica permite combinar las cualidades de la variedad y el portainjerto y acelera la entrada en producción, pero tiene dos grandes inconvenientes: reduce la diversidad genética del cultivo y perpetúa patógenos transmisibles por injerto (Morales Alfaro et al., 2023; Roistacher, 1991).

Los portainjertos son esenciales en el cultivo de cítricos, inciden directamente sobre el vigor y tamaño de la variedad, la producción y pueden tener tolerancia o resistencia a distintos factores bióticos y abióticos. Las especies más utilizadas son

naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), naranja agrio (*Citrus aurantium* L.), mandarina Cleopatra (*Citrus reshni* Hort. ex Tan.), limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush.), lima Rangpur (*Citrus limonia* Osb.), *Poncirus trifoliata* y los híbridos citrange, como el Troyer y el Carrizo (*Citrus sinensis* x *P. trifoliata*) y citrumelo, como el Swingle (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata*) (Agustí et al., 2014).

2.1.1. El cultivo de cítricos en Uruguay

En Uruguay los cítricos conforman el rubro de mayor importancia dentro del área hortifrutícola y representan aproximadamente el 6 % del producto bruto agrícola, generando un ingreso anual de 90 millones de dólares. El cultivo ocupa una superficie de 14.400 ha, con 7 millones de plantas y una producción de 300.000 toneladas al año, de las cuales el 46 % se exporta (DIEA, 2023). El sector cítrico se ha especializado en la producción de fruta fresca para el mercado externo, siendo proveedor en contraestación fundamentalmente para la Unión Europea y Estados Unidos. La región noroeste del país concentra el 91 % de la superficie plantada y de la producción, abarcando los departamentos de Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro y Rivera mientras que el sur concentra el 9 % restante, en los departamentos de Montevideo, San José, Canelones, Colonia y Maldonado. En lo que respecta a la composición por especies, el 40 % son naranjas, 40 % mandarinas, 19,5 % limones y 0,5 % pomelos (DIEA, 2023). En la región norte hay un fuerte predominio de naranjas y mandarinas y en el sur, de limones. Más del 90 % de los montes están injertados sobre *P. trifoliata* o sus híbridos, por ser tolerantes a bajas temperaturas y resistentes a nematodos, *Phytophthora* y CTV (Kawase et al., 1987).

2.1.2. Limitantes productivas de los cítricos

El volumen y la calidad de la fruta cítrica producida pueden ser afectados por factores abióticos y bióticos. Constituyen factores abióticos la salinidad y alcalinidad de los suelos, el anegamiento, las sequías, las heladas y las altas temperaturas, entre otros; la duración de estos fenómenos puede incluso comprometer la longevidad de la planta (Gómez-Cadenas et al., 1998; Ferguson y Grattan, 2005). Los factores bióticos están asociados fundamentalmente a la presencia de patógenos que compiten con la

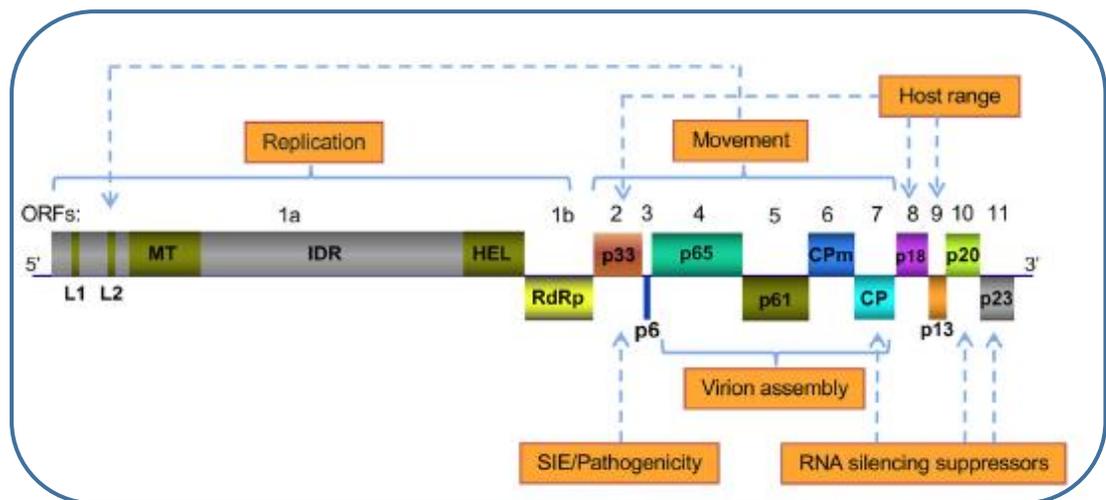
planta. Entre ellos, las enfermedades generan importantes pérdidas productivas, e incluso algunas tales como la gomosis (*Phytophthora* spp.), la tristeza y más recientemente el huanglongbing (HLB) han comprometido el cultivo de cítricos, lo que ha exigido la implementación de prácticas radicales de control como la sustitución de portainjertos y la producción de material vegetal bajo programas de saneamiento y certificación (Moreno et al., 2008; Roistacher et al., 2010).

2.2. La tristeza de los cítricos

La tristeza fue una de las enfermedades más devastadoras de la citricultura mundial; millones de árboles murieron en todo el mundo a causa de esta enfermedad (Dawson et al., 2015; Moreno et al., 2008). El término *tristeza* hace alusión al síntoma de declinamiento que muestran las especies cítricas afectadas cuando están injertadas sobre el portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.). El primer reporte de declinamiento y muerte de plantas fue en Argentina en 1930; luego, la mayoría de las regiones cítricas del mundo comenzaron a reportar síntomas asociados a la enfermedad, tales como aclaramiento de nervaduras (*vein clearing*), muerte de ramas (*die-back*), severas acanaladuras en la madera (*stem pitting*), enanismo (*stunting*) y clorosis (*seedling yellows*) en plántulas de limón (Bar-Joseph y Lee., 1989; Roistacher et al., 2010). Finalmente, se concluyó que todos ellos eran generados por un mismo agente causal, un virus limitado al floema denominado *Citrus tristeza virus* (Wallace, 1978). Esta enfermedad ha exigido la implementación de numerosas prácticas para contribuir a su manejo, tales como programas de erradicación, cuarentena, desarrollo de técnicas de diagnóstico, programas de certificación de plantas, protección cruzada y utilización de portainjertos resistentes o tolerantes (Folimonova et al., 2020; Moreno et al., 2008; Van Vuuren y Da Graça, 2000). No obstante, CTV continua su dispersión con variantes más agresivas y mantiene miles de árboles improductivos en Australia y Sudáfrica a causa de severas acanaladuras en la madera (Cook et al., 2021; Folimonova y Sun, 2022).

2.2.1 Agente causal: *Citrus tristeza virus* (CTV)

Citrus tristeza virus pertenece al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*. Es un virus filamentoso, su genoma consiste en una molécula de ARN monocatenario de sentido positivo de ~19,3 kb, contiene dos proteínas de cápside (PC), la PC de 25 Kda y la PC de 27 Kda, que encapsidan el 97 % y el 3 % de la longitud del virión, respectivamente (Agranovsky, 1996; Karasev, 2000). El genoma comprende doce marcos de lectura abiertos (ORFs) y dos regiones no traducidas (UTR) ubicadas en sus extremos 5' y 3' (Karasev et al., 1995). Se codifican al menos diecinueve proteínas implicadas en diferentes pasos del ciclo de infección del virus (figura 1) como la replicación, el ensamblaje, el movimiento, el rango de hospederos y la supresión del silenciamiento del ARN, entre otras (Folimonova y Sun, 2022).



Nota: tomado de Folimonova y Sun (2022).

Figura 1

Esquema del genoma de *Citrus tristeza virus*, indicando las proteínas virales y sus funciones (cuadros naranjas).

2.2.2. Síntomas

El rango de síntomas producidos por CTV es amplio, desde plantas asintomáticas hasta plantas que mueren (Dawson et al., 2015). La expresión y

severidad de ellos dependerá de la interacción: aislado del virus, portainjerto y combinación variedad/portainjerto (Folimonova et al., 2020; Moreno et al., 2008). Los síntomas típicos inducidos por CTV y más importantes a nivel productivo son el declinamiento y las acanaladuras en la madera (Dawson et al., 2015; Moreno et al., 2008; Roistacher et al., 2010), su manifestación consiste en:

a- Declinamiento: los árboles muestran clorosis generalizada, defoliación y pudrición de raicillas (figura 2: A, B), producto de la necrosis de las células del floema debajo de la zona del injerto (figura 2: C). Los fotoasimilados no llegan a la raíz, lo que provoca su muerte progresiva. Posteriormente, los síntomas se manifiestan en la parte aérea y culminan con el colapso de la planta. En ocasiones puede ocurrir un colapso rápido (*quick decline*) y el árbol muere en cuestión de días quedando completamente seco con las hojas y frutos sobre el mismo. El declinamiento ocurre en todas las especies de cítricos, excepto en limonero, cuando están injertadas sobre naranjo agrio.

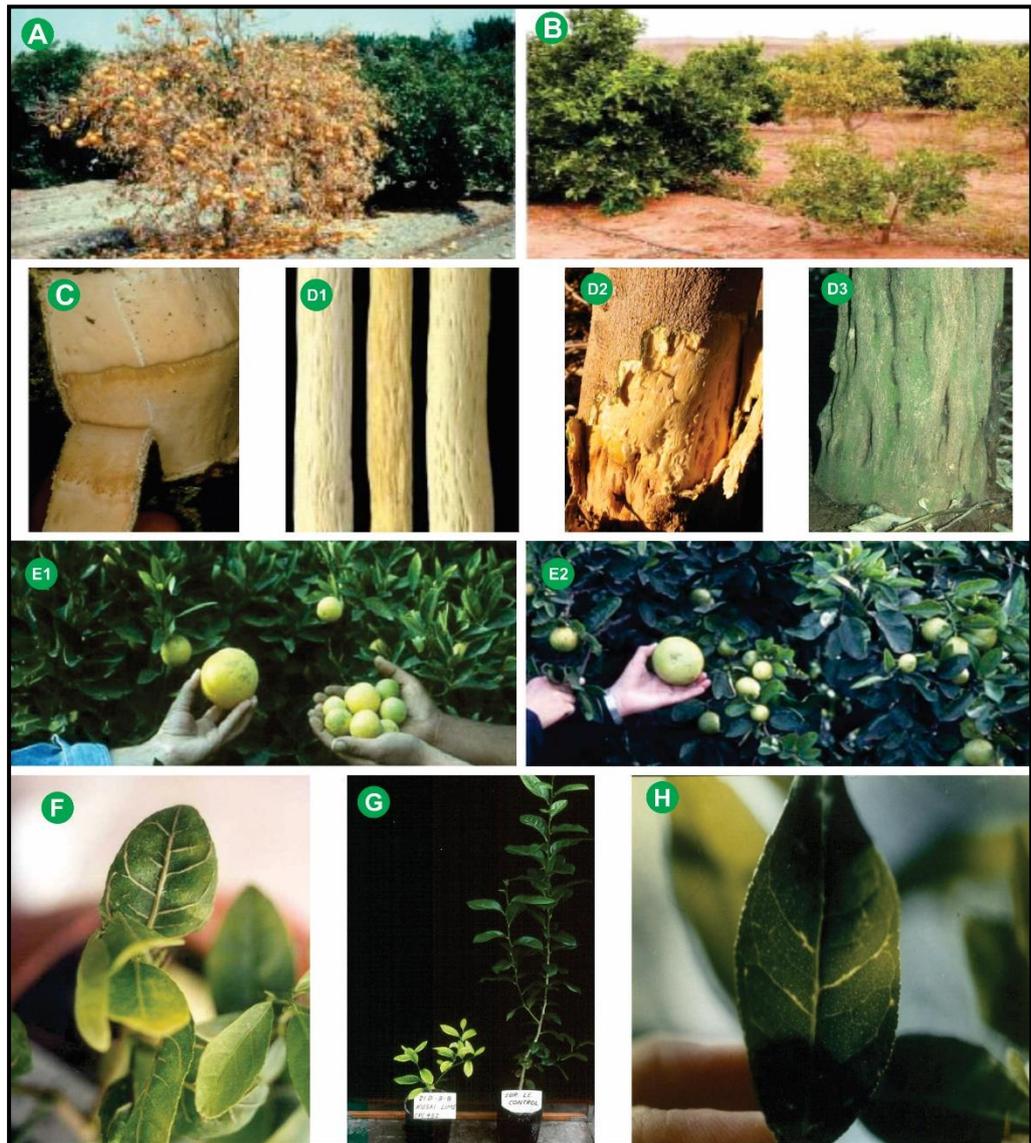
b- Acanaladuras en la madera o *stem pitting*: son estrías o acanaladuras longitudinales a nivel del xilema que se corresponden con proyecciones puntiagudas de la corteza (figura 2: D1, D2 y D3). Es típico en pomelo, naranjo dulce y lima Mexicana, independientemente del portainjerto utilizado. Constituye uno de los síntomas más relevantes, ya que no se controla mediante el uso de portainjertos resistentes a la tristeza y se asocia con una disminución en el tamaño de los frutos (figura 2: E1, E2) y en el rendimiento.

Otros síntomas, más típicos en condiciones de invernadero son:

c- Aclaramiento de nervaduras, típico en lima Mexicana (figura 2: H), síntoma indicador de CTV en testajes biológicos.

d- Amarillamiento del plantín o *seedling yellows*: fuerte reducción en el tamaño del plantín y clorosis severa (figura 2: G); puede manifestarse en naranjo agrio, limonero o pomelo.

e- Nervaduras corchosas y retraso de crecimiento en el plantín ocurren con la infección de aislados severos (figura 2: F).



Nota: tomado de Moreno et al. (2008) y Roistacher et al. (2010).

Figura 2

Síntomas de CTV: A y B, árboles con declinamiento (A) rápido, (B) progresivo; C, necrosis de las células del floema debajo del injerto; D1, acanaladuras en ramas; D2 y D3, acanaladuras en tronco; E1 y E2, frutos de pomelo injertado en *P. trifoliata* afectados por acanaladuras severas; F, nervaduras corchosas en lima Mexicana; G, plantín con enanismo y clorosis (*seedling yellows*) (izquierda), plantín normal (derecha); H) aclaramiento de nervaduras en hoja de lima Mexicana.

2.2.3. Hospederos

CTV está restringido a la familia *Rutaceae* y en particular a las especies e híbridos de los géneros *Citrus* y *Fortunella* (Dawson et al., 2013). Existe una compleja interacción huésped-patógeno, que se manifiesta con una amplia gama de respuesta en patogenicidad (Albiach-Martí, 2012). La lima Mexicana y el cidro son muy sensibles y muestran síntomas con casi todos los aislados, por ello la lima ha sido seleccionada como planta indicadora para este virus (Roistacher, 1991). *C. macrophylla*, el naranjo agrio y el limón también son susceptibles. Pomelos y naranjos dulces pueden ser susceptibles o tolerantes en función del aislado de CTV que los afecte (Bar-Josephy Lee, 1989; Dawson et al., 2013). Mandarinos, tangelos y tangor son frecuentemente tolerantes a CTV (Albiach-Martí, 2012). *Poncirus trifoliata* y sus híbridos han mostrado resistencia al declinamiento. El virus tenía la capacidad de replicarse en los portainjertos trifoliados, pero no tenía movilidad desde los sitios de infección al resto de la planta, hasta que surgieron aislados (RB) capaces de superar esa resistencia y colonizar a los trifoliados de forma sistémica (Dawson y Mooney, 2000; Albiach-Martí et al., 2004).

2.2.4. Transmisión de CTV

CTV puede ser transmitido a plantas sanas mediante injerto de material infectado y a través de diversas especies de pulgones (Dawson et al., 2015; De Mendoza et al., 1984). Por lo tanto, la dispersión del virus a nuevas áreas generalmente es consecuencia de la propagación de yemas infectadas, mientras que la dispersión regional la provocan los pulgones. Éstos transmiten el virus en forma semipersistente, no circulativa, con un período de adquisición que varía de 30 min a 24 h, pudiendo ser transmitido hasta 1-2 días después de haberlo adquirido (Rocha-Peña et al., 1995). La eficiencia de transmisión puede ser afectada por la especie de áfido, la especie huésped del virus, la planta receptora, el aislado de CTV y las condiciones ambientales (Harper et al., 2018; Rocha-Peña et al., 1995). *Toxoptera citricida* es la especie más eficiente

en transmitir el virus (Broadbent et al., 1996; Yokomi et al., 1994), incluso en transmitir las cepas más severas.

2.2.5. Aislados de CTV

Los aislados de CTV presentan gran variabilidad genética y reacciones biológicas diversas (Dawson et al., 2015; Moreno et al., 2008). La mayoría de ellos son poblaciones complejas, constituidas por más de un genotipo (Albiach-Martí et al., 2000) que posiblemente se generaron por eventos de recombinación, mutación e infecciones mixtas, producto de la coexistencia durante años del hospedero y el vector en el campo (Albiach-Martí, 2012; Iglesias et al., 2008). Además, en una planta la distribución de las variantes genómicas puede ser diferencial y segregarse mediante el pasaje de un pulgón, material de propagación o por el cambio de hospedero (Ayllón et al., 1999; Hernández-Rodríguez et al., 2019; Korkmaz et al., 2022). Por tanto, la transmisión por el vector, así como la propagación de plantas desde material enfermo puede derivar en cambios estructurales de la población viral (Ayllón et al., 1999; Harper et al., 2018). A pesar de esta diversidad, el análisis de secuencias completas ha determinado que la mayoría de los aislados de CTV pueden clasificarse en al menos ocho grupos: T3, T30, T36, VT, T68, RB, HA16-5 y S1, según la composición del genoma mayoritario, pero cada grupo puede tener variaciones en virulencia y, por lo tanto, no pueden ser asociados a un fenotipo (Dawson et al., 2015; Yokomi et al., 2018). Su nomenclatura responde al código del aislado, origen geográfico o características fenotípicas (Sun et al., 2024), se denominan: T3, T30, T36 y T68 (aislados tipo de Florida, EE. UU.), VT (aislado de naranja valencia de Israel), RB (aislados *resistance breaking* en trifoliados), HA16-5 (variante proveniente de Hawai), S1 (variante recombinante de California, EE.UU.).

2.2.5.1. El genotipo RB de *Citrus tristeza virus*

P. trifoliata y algunos de sus híbridos han mostrado resistencia frente a una amplia gama de aislados de CTV, por lo que ha sido un portainjerto ampliamente utilizado para evitar el declinamiento por tristeza (Moreno et al., 2008; Rostaicher et al., 2010). Estudios genéticos han confirmado la presencia de al menos dos genes

involucrados en dicha resistencia: Rsv (responsable de impedir el movimiento sistémico del virus en la planta) y R (asociado con la respuesta hipersensible local) (Mestre et al., 1997), ambos limitaban la movilidad del virus (Albiachi-Martí et al., 2004). No obstante, hace ya varios años, se identificó en Nueva Zelanda un aislado capaz de superar esa resistencia en *P. trifoliata* (Dawson y Mooney, 2000), esta variante fue denominada RB (*resistance breaking*) y es, hasta el momento, el único genotipo de CTV capaz de infectar sistémicamente a *P. trifoliata* (Yokomi et al., 2017). En 2010, Harper et al. reportaron cinco nuevos aislados RB en Nueva Zelanda mediante secuenciación completa de sus genomas. Posteriormente, se han identificado aislados RB en Hawái (Melzer et al., 2010), Puerto Rico (Roy et al., 2013), República Dominicana (Matos et al., 2013) y Sudáfrica (Scott et al., 2013). Más recientemente, hubo reportes en Uruguay, California, y China (Hernández-Rodríguez et al., 2017; Yokomi et al., 2017; Wang et al., 2019).

A pesar de los numerosos reportes de la línea RB en distintas regiones cítricas del mundo, no se dispone aún de información sobre las limitantes productivas que podría ocasionar esta variante del virus. En Sudáfrica se ha citado que el genotipo RB genera acanaladuras suaves a moderadas en pomelos (Cook, 2019), así como declinamiento y acanaladuras suaves a severas en especies indicadoras (Dawson y Mooney, 2000). En California ha inducido síntomas suaves en indexajes biológicos (Yokomi et al., 2017) y en Puerto Rico ha sido asintomática en Carrizo (Roy et al., 2013). No obstante, CTV presenta numerosos eventos de recombinación y mutación (Harper et al., 2010; Rubio et al., 2001; Weng et al., 2007) que podrían originar nuevas variantes, más severas, con repercusiones a nivel productivo.

2.3. CTV y el genotipo RB en Uruguay

En nuestro país, la tristeza es endémica y está presente *Toxoptera citricida*, su vector más eficiente (Bentancour et al., 2009). A partir de 1930 esta enfermedad provocó la muerte de miles de plantas en plena producción injertadas sobre naranjo agrio. Parte de la solución a la enfermedad fue la sustitución del portainjerto naranjo agrio por los portainjertos trifoliados resistentes al declinamiento. Si bien *P. trifoliata* permite la replicación del virus (Albiachi-Martí et al., 2004), impedía su movimiento y

por tanto la infección sistémica y el declinamiento (Dawson y Mooney, 2000). Sin embargo, tanto en Uruguay como en otras regiones citrícolas, se han observado pérdidas de productividad en pomelos y ciertas variedades de naranjo dulce por acanaladuras en la madera, aun cuando están injertados sobre portainjertos trifoliados (Cook et al., 2021; Folimonova y Sun, 2022; Müller y Campiglia, 1981).

Actualmente, el sector citrícola uruguayo se encuentra en un proceso de reconversión de sus montes, instalando materiales libres de enfermedades de propagación vegetativa, entre ellas la tristeza, proporcionados por el Programa Nacional de Saneamiento y Certificación de Cítricos (PNSCC). Sin embargo, dado que el virus y el vector coexisten en condiciones de campo, se espera que las plantas producidas sean infectadas en pocos años. Una estrategia de manejo viable en nuestra situación sería la inoculación de las plantas saneadas, previo a su liberación para campo, con aislamientos débiles protectores, medida que se conoce con el nombre de *protección cruzada* o *preinmunización* y es usada con éxito en varios países citrícolas como Japón, Brasil y Sudáfrica (Costa et al., 2010; Da Graça y Van Vuuren, 2010). Para implementar esta tecnología, es necesario conocer las características de los aislados locales del virus. Por ello, desde el año 2012 se han desarrollado varias líneas de trabajo con la finalidad de conocer la variabilidad local genética y fenotípica de CTV y aportar herramientas para una estrategia de manejo del virus que complemente al PNSCC. Los resultados muestran una alta variabilidad genética del virus, con predominio de variantes severas (Rubio et al., 2018). Se identificaron algunos aislados promisorios para protección cruzada y se reportó el genotipo RB (Hernández-Rodríguez et al., 2017), por lo que el escenario para el manejo de CTV en Uruguay es complejo.

El riesgo potencial que implica la presencia del genotipo RB en Uruguay es altamente significativo, dado que *P. trifoliata* y sus híbridos son los principales portainjertos y una de las razones primordiales de su uso es, justamente, evitar los efectos negativos de la tristeza. Este genotipo fue primeramente identificado en secuencias parciales de los genes *p20*, *p23* y *p25*, en aislados que fueron colectados hace más de quince años y han permanecido en invernadero sin ser expuestos a intercambio genético. Estos resultados confirman que la línea RB circula en el país

desde hace mucho tiempo, pero lo hemos encontrado en baja frecuencia, quizás porque tiene asociación significativa con portainjertos trifoliados (Harper et al., 2014) y nuestros muestreos han estado dirigidos a la copa del árbol. Luego, se obtuvo un subaislado RB, mediante ensayos de transmisión con áfidos a partir de muestras colectadas en el año 2014 de una planta de campo (Navel/*P. trifoliata*) asintomática de veintitrés años. Posteriormente, para confirmar el fenotipo RB, el subaislado fue inoculado en plántulas de *P. trifoliata*, donde logró replicarse e infectarlo sistémicamente (Hernández-Rodríguez et al., 2017).

2.4. Interacción planta-patógeno.

Los virus son parásitos intracelulares obligados que ingresan a la célula vegetal a través de heridas causadas por daños físicos o por la acción de vectores y utilizan el metabolismo celular del huésped para replicarse y moverse, lo que altera su funcionamiento normal. No obstante, las plantas han generado mecanismos para reconocer y defenderse de los patógenos, los cuales pueden ser innatos (genéticamente determinados) o adaptativos (inducidos por la presencia del patógeno) (Carr et al., 2019). La respuesta innata consiste en la utilización de estrategias químicas o estructurales para evitar la infección, de modo que la planta resulta no hospedante del patógeno; esta respuesta puede involucrar alteraciones en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y flujos de iones, acumulación de ácido salicílico y depósitos de calosa (Carr et al., 2019). Si el patógeno supera estas barreras, la planta puede desencadenar los mecanismos adaptativos (Calil y Fontes, 2017).

Sin embargo, es esperable que ocurran múltiples interacciones planta-virus. Puede suceder que la planta no reconozca la partícula viral o que su sistema innato sea ineficiente y no se desencadenen los mecanismos adaptativos; en este caso, se establece una interacción compatible entre la planta y el virus, donde el virus infecta exitosamente la planta (Calil y Fontes, 2017; Hammond-Kosack y Jones, 2000). Por el contrario, si la planta reconoce la partícula viral, se establece una interacción incompatible, desfavorable para el virus. En estas condiciones, la planta desencadena respuestas de defensa que pueden limitar la replicación y el movimiento del virus, y lo confinan al sitio inicial de infección (Hammond-Kosack y Jones, 2000), en lo que se

denomina *respuesta de hipersensibilidad*. Esta es una reacción local, en la que se produce la muerte celular programada en el sitio de infección (Heath, 2000). La reacción de hipersensibilidad desencadena además la producción de especies químicas oxidantes (Lamb y Dixon, 1997), se sintetiza calosa, lignina (Zavaliev et al., 2011) y aumenta los niveles de ácido salicílico (Malamy et al., 1990). El aumento de ácido salicílico es una señal que es luego amplificadora y desencadena la resistencia sistémica adquirida, cuyo fin es prevenir a la planta de infecciones secundarias (Carr et al., 2019; Lim et al., 2016; Mandadi y Scholtho, 2013) induciendo la producción de hormonas (ácido jasmónico, salicílico y etileno) y activando finalmente los genes de defensa de la planta. Además, la planta puede activar el mecanismo de *silenciamiento génico* (Carr et al., 2019; Mandadi y Scholtho, 2013). Este mecanismo consiste en que los ácidos nucleicos virales son reconocidos por endonucleasas de la planta, las cuales lo fragmentarán y usarán como molde para degradar el genoma viral (Carr et al., 2019; Csorba et al., 2015). Como contrapartida, el virus dispone de proteínas supresoras del silenciamiento (Carr et al., 2019; Poque et al., 2018), cuya función es interferir con la actividad de las endonucleasas para continuar con su replicación, movimiento en la planta e inducción de la enfermedad.

2.4.1. Consecuencias de la infección viral para la planta

2.4.1.1 Efectos en la fotosíntesis

La fotosíntesis está estrechamente regulada y su eficiencia depende en gran medida de factores bióticos y abióticos que influyen en el estado de la maquinaria fotosintética. En general, la infección por un virus provoca una reducción en la actividad fotosintética (Rahoutei et al., 2000) al interferir directamente sobre los componentes fotosintéticos y las reacciones fotosintéticas primarias, en particular en el fotosistema II (PSII) (Pérez Bueno, 2003; Pérez Bueno et al., 2004). En plantas infectadas se ha observado inhibición del transporte electrónico fotosintético, hecho que ha sido atribuido a la interacción de algún componente viral con procesos tales como la síntesis y transporte de proteínas del PSII (Pérez Bueno et al., 2004; Rahoutei et al., 2000) o del ciclo de Calvin-Benson (Dawson y Hilf, 1992). Además de las etapas

lumínicas, se producen cambios en el metabolismo de carbohidratos y su transporte a través del floema, lo que altera la expresión génica y las rutas metabólicas de la planta y resulta en una menor síntesis de enzimas y pigmentos fotosintéticos (Balachandran et al., 1997; Herbers et al., 2000). También se ha observado que la infección viral puede afectar la apertura estomática o difusión en el mesófilo, procesos que controlan la asimilación de CO₂ (Sampol et al., 2003).

Los efectos del virus sobre la fotosíntesis pueden ser evaluados a través de la fluorescencia de las clorofilas (Arbona et al., 2009; López-Climent et al., 2008), que es una pequeña fracción de la energía total disipada. Esta medida puede indicarnos la eficiencia del PSII al informar sobre la tasa de transporte de los electrones, el rendimiento cuántico y la existencia de fotoinhibición de la fotosíntesis. También se pueden determinar la tasa fotosintética neta, la tasa de transpiración y la conductancia estomática mediante la cuantificación de los parámetros de intercambio gaseoso.

2.4.1.2. Estrés oxidativo

La infección viral constituye un estrés para la planta. Todo estrés altera el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y la producción normal de especies oxidantes o reductoras, denominadas *especies reactivas de oxígeno* (ROS) (Arbona et al., 2008; Azcón-Bieto y Talón, 2008). Las ROS son especies químicas muy reactivas y con poder oxidante; el exceso de ellas puede dañar diversos componentes celulares, pues son capaces de inducir la oxidación de los ácidos nucleicos, la ruptura de los enlaces peptídicos y la oxidación de los grupos carbonilo, de los lípidos de membrana, polisacáridos y ácidos grasos poliinsaturados (Sies, 1991). Entre las ROS se encuentran los radicales libres superóxido (O₂⁻¹), hidroxilo (OH⁻¹), peróxido (H₂O₂) y oxígeno singlete (¹O₂). Normalmente, los niveles de ROS son controlados por mecanismos antioxidantes que pueden ser a) enzimáticos: catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y glutatión reductasa y b) no enzimáticos: ácido ascórbico y glutatión (hidrosolubles), carotenoides y α-tocoferol (liposolubles) (Dos Santos Soares y Machado, 2007; Sies, 1993). Una infección viral puede inducir una acumulación de ROS en niveles que exceden la capacidad antioxidante de la planta, lo que desencadena un estrés oxidativo (Sies, 1997), con potencial para causar

destrucción celular y daños en los tejidos del hospedero. Este daño oxidativo puede determinarse indirectamente mediante varios indicadores, siendo uno de ellos la producción de malondialdehído (MDA). El MDA es un subproducto de la peroxidación de lípidos en las membranas biológicas y un aumento en su nivel indica un incremento del daño oxidativo (Arbona et al., 2008).

2.4.1.3. Efectos sobre el crecimiento de la planta

Las infecciones virales alteran numerosos procesos metabólicos y fisiológicos en sus hospederos, lo que pueden interferir con su normal desarrollo (Dawson et al., 2013; Dória et al., 2015). Así, las enfermedades producidas por virus se caracterizan por manifestar en su hospedero síntomas tales como clorosis, epinastia, deformaciones y retraso del crecimiento (Islam, 2017). Estas alteraciones son consecuencias de cambios metabólicos en el hospedero tales como el balance hormonal, la acumulación de ROS y la reducción en la disponibilidad del carbono fijado durante la fotosíntesis, entre otros (Hull, 2014). Generalmente, durante la infección, la concentración de auxinas y giberelinas disminuye y se incrementa el ácido abscísico, lo que genera deformaciones, caída de hojas y menor crecimiento vegetativo (Hull, 2014; Islam et al., 2019). También se altera el metabolismo de los carbohidratos, con acumulación azúcares y almidón en los tejidos infectados, lo que limita el suministro de asimilados hacia los órganos en crecimiento (Hull, 2014).

2.4.1.4. Mecanismos de defensa de la planta

Las plantas han desarrollado varios mecanismos para limitar la replicación y propagación de los virus, más allá de las barreras físicas o estructurales. El reconocimiento del patógeno desencadena respuestas secundarias, como lo es un aumento en el flujo de iones a través de la membrana, la producción de ROS, y cambios en la expresión de genes. Así, se activan enzimas, hormonas y metabolitos secundarios (Dória et al., 2015) para fortalecer la pared celular, combatir las ROS y reducir el daño celular. También se sintetizan proteínas de defensa y puede desencadenarse una respuesta de hipersensibilidad o de resistencia sistémica adquirida, como ya fue mencionado. La respuesta vegetal a la infección puede ser evaluada mediante el

análisis del contenido de enzimas antioxidantes (Arbona et al., 2003; Pérez-Climent et al., 2015), el análisis de la expresión génica (Aknadibossian et al., 2023) y la determinación de carotenoides totales y ciclo de las xantofilas (Logan et al., 1998).

2.4.2. Infección con CTV y efectos sobre la fisiología de los cítricos

El género *Citrus* está integrado por muchas especies, variedades e híbridos intergenéricos con los cuales CTV interactúa y provoca diversas respuestas fisiológicas y bioquímicas. En algunos casos, CTV invade la planta pero no induce síntomas (planta tolerante); en otros, el virus induce la enfermedad (planta sensible) y, en otros, el virus no puede replicarse o moverse (planta resistente) (Albiach-Martí, 2012; Dawson et al., 2013). La interacción *Citrus*-CTV es tan compleja que ha sido difícil dilucidar los mecanismos involucrados en el desarrollo de la enfermedad o en la resistencia de la planta. No obstante es esperable que, en ciertas circunstancias, el virus afecte la maquinaria fotosintética y la producción de ROS y desencadene los mecanismos de respuesta antioxidante (Hull, 2014). Sin embargo, estos efectos han sido poco evaluados. Algunos estudios han confirmado que la infección con CTV provocó una reducción de la actividad fotosintética en plantas de lima Mexicana que, junto a la incapacidad de activar mecanismos de disipación de energía en el fotosistema II, provocó daño oxidativo en los tejidos vegetales (Pérez-Clemente et al., 2015). Sin embargo, Hancevic et al. (2018) en un experimento de largo plazo, no encontraron cambios a nivel de fotosíntesis, tasa de respiración y contenido de clorofila en plantas de lima Mexicana inoculadas con CTV. No obstante, cambios en la expresión de genes y perfil de proteínas implicadas en rutas biológicas muy significantes (tales como: defensa, remodelación de la pared celular, proteasas, desarrollo vascular, chaperonas de estrés, y ARNm, entre ellas se mencionan PLCPs y CsSAG21) en plantas infectadas también fueron reportados (Aknadibossian et al., 2023; Folimonova y Sun, 2022; Pérez-Clemente et al., 2015). Además, hay reportes de regulación hormonal en respuestas al estrés biótico y una represión generalizada del metabolismo secundario (Pérez-Clemente et al., 2015), así como también una actividad diferencial de las enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa y

peroxidasa) en plantas infectadas con respecto a plantas control, sin inocular (Dória et al., 2015).

3. Hipótesis y objetivos

3.1. Hipótesis

El genotipo RB de CTV afecta parámetros fisiológicos de *P. trifoliata* que disminuyen su eficiencia como portainjerto y reducen la productividad del cultivo de cítricos.

3.2. Objetivo general

Determinar las características de un aislado RB local (RB-UY1) de *Citrus tristeza virus* y su efecto sobre *P. trifoliata*.

3.3. Objetivos específicos

1. Establecer la severidad del aislado RB local mediante bioensayos en plantas indicadoras.
2. Determinar el genoma del aislado RB local.
3. Evaluar la eficiencia de transmisión del aislado RB por *Toxoptera citricida*.
4. Analizar los efectos del aislado RB sobre los principales parámetros fisiológicos en el portainjerto *P. trifoliata* y en plantines de cítricos, usando lima Mexicana (*Citrus aurantifolia/P. trifoliata*) y naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osb. cv. Washington navel/*P. trifoliata*) como modelos.

4. Biological and molecular characterization of a resistance-breaking isolate of *Citrus tristeza virus* from Uruguay and its effects on *Poncirus trifoliata* growth performance*

4.1 Resumen

Los aislados RB (*resistance-breaking*) de *Citrus tristeza virus* (CTV) pueden replicarse y moverse sistémicamente en *Poncirus trifoliata*, portainjerto ampliamente usado para evitar el declinamiento por CTV y con otros fines. En Uruguay, predominan aislados severos de CTV y un aislado RB (denominado *RB-UY1*) fue recientemente identificado. Con la finalidad de conocer las implicancias de la circulación de este genotipo para cítricos injertados sobre portainjertos trifoliados, el objetivo de este trabajo fue determinar las características biológicas y genéticas de este aislado, su eficiencia de transmisión por *Toxoptera citricida* y sus efectos sobre el crecimiento de *P. trifoliata*. Nuestros resultados concluyeron que *RB-UY1* es un aislado suave, que está filogenéticamente asociado con el grupo RB1 y que se transmite eficientemente por *T. citrida*. También sugieren que el aislado *RB-UY1* no debería afectar el rendimiento de los cultivos de cítricos injertados sobre portainjertos trifoliados, aunque algunos parámetros de crecimiento en *P. trifoliata* se vieron afectados cuatro años después de la inoculación.

Palabras clave: aislados RB, *Poncirus trifoliata*, caracterización biológica, transmisión por áfidos, desempeño de crecimiento

*Artículo publicado en *Archives of Virology* (2023), 168:123.

<https://doi.org/10.1007/s00705-023-05749->

4.2. Summary

Resistance-breaking (RB) isolates of *Citrus tristeza virus* (CTV) can replicate and move systemically in *Poncirus trifoliata*, a rootstock widely used for management of decline caused by CTV and other purposes. In Uruguay, severe CTV isolates are prevalent, and an RB isolate (designated as RB-UY1) was identified. In order to predict the implications of this genotype circulating in citrus crops grafted on trifoliolate rootstocks, the aim of this work was to determine the biological and molecular characteristics of this isolate, transmission efficiency by *Toxoptera citricida*, and its effects on plant growth performance of *P. trifoliata*. Our results show that RB-UY1 can be classified as a mild isolate, that it is phylogenetically associated with the RB1 group, and that it is efficiently transmitted by *T. citrida*. They also suggest that the RB-UY1 isolate should not affect the performance of citrus crops grafted on trifoliolate rootstocks, although some growth parameters of *P. trifoliata* seedlings were affected four years after inoculation.

Keywords: RB isolate, *Poncirus trifoliata*, biological characterization, aphid transmission, growth performance.

4.3. Introduction

Citrus tristeza virus (CTV), a member of the genus *Closterovirus* (family *Closteroviridae*), is the causal agent of tristeza, the most important viral disease of citrus (Roistacher et al., 2010). The virus is a phloem-limited pathogen that causes three major diseases on citrus hosts: decline, stem pitting, and seedling yellows (Moreno et al., 2008). CTV is a single-stranded, positive-sense RNA virus whose genome contains 12 open reading frames (ORFs) and 5' and 3' untranslated regions (UTRs) (Dawson et al., 2015). It is transmitted through grafting and by various aphid species in a semipersistent manner (Dawson et al., 2015; Yokomi et al., 2010). The virus has a high degree of genetic and biological diversity (Moreno et al., 2008). Eight genotypes have been described: T36, VT, T3, T68, T30, RB, HA16-5, and S1, and new genotypes are constantly emerging, such as the recently described genotypes L1, M1, and A18 (Harper, 2013; Yokomi et al., 2018; Wang et al., 2020). However, the association of this genetic diversity with symptom expression, which depends on the isolate, the rootstock-scion combination, the climate conditions, and the vector population, is still poorly understood (Moreno et al., 2008; Roistacher et al., 2010).

In Uruguay, tristeza disease is currently endemic, as well as its most efficient vector, *Toxoptera citricida* (Hemiptera: Aphididae). Decline symptoms have been managed through the use of CTV-resistant trifoliolate rootstocks, but stem pitting in grapefruit and sweet orange and reduction in fruit size have been observed (Francis et al., 1997). In recent years, a high incidence and genetic diversity of the virus, as well as the prevalence of severe isolates and the presence of the RB genotype, have been reported in the country (Benítez-Galeano et al., 2018; 2021; Hernández Rodríguez et al., 2017; Rubio et al., 2019). The RB genotype is especially a concern in countries where the main citrus crops are grafted onto *Poncirus trifoliata* rootstocks and its hybrids (i.e., Argentina, Uruguay, Japan, and Spain), in which this strain can replicate and move systemically (Albiach-Martí et al., 2004; Yokomi et al., 2017). Because *P. trifoliata* provides resistance to most CTV genotypes and tolerance to a wide range of pathogens and cold temperatures, more than 95% of the citrus trees in Uruguay are grafted onto it.

RB isolates were first reported in New Zealand (Dawson and Money, 2000), and later in Hawaii (Melzer et al., 2013), Puerto Rico (Roy et al., 2013), the Dominican Republic (Matos et al., 2013), and South Africa (Scott et al., 2013). More recently, they have been found in California, Uruguay, and China (Yokomi et al., 2017; Hernández-Rodríguez et al., 2017; Benítez-Galeano et al., 2018; Wang et al., 2019). In Uruguay, partial sequences of this genotype have been found at low frequency in mixed infections, and an isolate was obtained using single-aphid transmission (Hernández-Rodríguez et al., 2017). Despite numerous reports about RB isolates, there is little information on the effect of this genotype on the growth of *P. trifoliata*. Although some studies suggest that this genotype causes systemic but asymptomatic infections in *P. trifoliata* and Carrizo citrange (Harper et al., 2010; Roy et al., 2013), other studies have shown that some isolates from New Zealand and South Africa can induce mild to moderate stem pitting in *P. trifoliata* (Cook et al., 2016; Dawson and Money, 2000). In biological indexing, most RB isolates produce vein clearing in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) and are classified as mild isolates (Roy et al., 2013; Yokomi et al., 2017). However, mild to severe stem pitting and decline have also been observed in indicator species (Cook et al., 2016; Wang et al., 2019). Phylogenetically, RB isolates diverge into two separate clusters, designated RB1 and RB2 (Yokomi et al., 2017). The RB1 group mostly includes isolates from New Zealand (the first RB isolates reported) but also includes some isolates from California and Puerto Rico, whereas the RB2 group includes isolates detected in South Africa, Hawaii, California, and Taiwan. The aim of this work was to assess the biological and molecular characteristics of a local RB isolate, its transmission efficiency, and its effect on *P. trifoliata* growth performance.

4.4. Materials and methods

4.4.1. CTV isolates

The RB-UY1 isolate was obtained by single-aphid transmission from a field isolate under experimental conditions. Subsequently, graft-inoculation and replication of this isolate on *P. trifoliata* confirmed its RB phenotype (Hernández-Rodríguez et

al., 2017). The other CTV sources used in this work were from our local collection of CTV isolates at INIA Salto Grande (Lat, S 31° 16m 22s, Long. W 57° 53m 27s, Alt. 47 m ASL). All isolates were kept on Mexican lime seedlings in an insect-proof glasshouse following standard procedures (Roistacher, 1991).

4.4.2. Molecular characterization of the RB-UY1 isolate

4.4.2.1. RNA extraction, cDNA synthesis, and sequencing

The complete genome sequence was obtained by amplifying overlapping genome regions. Seven overlapping amplicons covering the complete viral genome were obtained using primers described in Table 1 (top). PCR products were purified and sequenced by the Sanger method. When overlapping sequences were not clear, new sets of primer pairs were designed (Table 1, bottom) using Primer3 Plus software. Sanger sequence data were edited and assembled using Unipro UGENE v41.0 Software.

Table 1. Primers used to amplify seven overlapping amplicons covering the entire RB viral genome (top) and primers designed in this work (bottom) for sequencing the whole RB-UY1 genome by the Sanger method.

Primers	Sequence 5'-3'	Genome Position	Amplicon Size	T _m (°C) ^a
5'UTR F2	TCGATTCAAATTCACCCGTATCC	5 to 27	3013	42
AR3R	TCTTCACCACCCATCTTGTGATAC	2995 to 3018		
AR2F (Roy et al. 2013)	GGTACGGTGTCTGTYTTATGTCGGA	1163 to 1188	5773	52
IDR R3 (Roy et al. 2013)	CCAAGACCTCCGATTTGTTCAAATC	6911 to 6936		
IDRF2 (Roy et al. 2013)	GTGGGTTACAGTAAGCAYGAGTTTCT	5534 to 5560	5787	54
p33R1	CTGCATATGAATTCACACTACG	11302 to 11321		
POL F1	ATCTTCTGTCATACGAAAGTCG	9427 to 9448	4387	50
p65R2 (Roy et al. 2013)	TCAGAGAGGTARTCTTTCCAAATCYCTTC	13786 to 13814		
p65F1 (Roy et al. 2013)	ATGGTRCTYCTGGGTTTAGACTTYGGTAC	12030 to 12058	4748	54
p25R (Iglesias et al. 2008)	TCAACGTGTGTTGAATTTCCC	16786 to 16806		
CPG1F (Roy et al. 2013)	ATGGACGACGARACAAAGAAAYTRAAGA	16135 to 16162	2870	50
p23R (Iglesias et al. 2008)	CAATCAGATGAAGTGGTG	18988 to 19005		
p20F (Rubio et al. 2001)	ACAATATGCGAGCTTACTTTA	17739 to 17759	1529	52
3'UTRR	TATGTTGGCCCCCATAGG	19251 to 19268		
5UTR	CTACAGACCCGGTCCTTGTG	1065 to 1084	791	59
AR3R	TTGACGTATGTGCAAACCGC	1837 to 1856		
I-F	TTGCTACATTCGCCACTTCG	2694 to 2713	1073	59
I-R	ACCACCAAGCAAGGAGTACG	3748 to 3767		
II-F	CGGTGTGACAGCGACTTGAT	3885 to 3905	1017	60
II-R	CCTGGTCAGATTGACCGCAA	4883 to 4902		
III-F	TTCGCGTGCCACTGAATACT	5985 to 6004	1538	60
III-R	CATCACCGTTTACCGCGTTT	7503 to 7522		
IV-F	CGCGTTCGCGTATTTTCGTTA	11592 to 11611	859	59
IV-R	CGCAAGAGTAACCCGACAAG	12432 to 12451		
V-F	CCAAGGGTATTGGCAACCGT	16414 to 16433	1648	60
V-R	TCTGACAGCACCGCCTTAAC	18043 to 18062		

a: annealing temperature

Total RNA was extracted using the procedure described by Arruabarrena et al. (2016). Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed using random primers and reverse transcriptase (Thermo Scientific, MA, USA) in a total reaction volume of 20 µl, following the manufacturer's instructions. PCR amplification was performed using 3 µl of undiluted cDNA product, 400 nM each primer, and 1X MyFi Mix (Bioline USA Inc., USA) in a 50 µl reaction mixture according to the manufacturer's instructions. For large amplicons, the cycling conditions included an initial

denaturation step at 95°C for 1 min, followed by 35 cycles of 30 s at 98°C, 25 s at the temperature indicated for each primer in Table 1 (top), and 6 min at 72°C, with a final extension step of 6 min at 72°C. For shorter amplicons (primers in Table 1, bottom), the cycling conditions were the same except for the extension steps: 1 min at 72°C, with a final extension step of 2 min at 72°C. PCR products were purified and sequenced using Macrogen sequence services (Seoul, South Korea).

4.4.2.2. Phylogenetic analysis

The complete RB-UY1 genome sequence was aligned with those of RB reference genotypes (Harper, 2013; Yokomi et al., 2017) and other CTV genome sequences retrieved from the GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) using Multiple Alignment Fast Fourier Transform (MAFFT) version 7 software.

Phylogenetic analysis was performed using the maximum-likelihood method and the Tamura and Nei model (Tamura and Nei, 1993). A phylogenetic tree based on 58 genomic nucleotide sequences was constructed using MEGA11 software (Tamura et al., 2021).

4.4.2.3. Sequence comparisons

The complete genome and p20, p23, p25, p27, and p61 sequences of RB-UY1 were compared to those of the strains NZRB-M12 (FJ525431), B390-5 (KU883265), and DSST-17 (MH186146) at both the nt and aa levels using BioEdit version 7.2.6 (Hall, 1999) and SimPlot version 3.5.1 (Lole et al., 1999).

4.4.2.4. Recombination analysis

To confirm the evidence of recombination observed in the sequence similarity plot, a BootScan analysis was performed using SimPlot software. The RB genotype sequence NZRB-M12 (FJ525431), the T3 genotype sequence KC525952, and the Uruguayan sequence DSST-17 (GenBank accession no. MH186146) were used as probable parental strains.

4.4.3. Biological characterization of RB-UY1

4.4.3.1. Biological characterization of RB-UY1 on indicator plants

Bioassays were carried out in an insect-proof and temperature-controlled glasshouse (18 to 24°C). The RB-UY1 isolate and six other previously characterized mild and severe local reference isolates (Hernández-Rodríguez, et al., 2017) were graft-inoculated onto Mexican lime (ML) (*Citrus aurantifolia*), sour orange (SO) (*Citrus aurantium*), Duncan grapefruit (DG) (*Citrus paradisi*), and Madame Vinous sweet orange (SW) (*Citrus sinensis*). Three replicates were performed per isolate. CTV infection was confirmed by DAS-ELISA using a Magic-DAS ELISA Kit (Plant Print Diagnostics S.L., Valencia, Spain), following the manufacturer's instructions. Symptoms and their severity were evaluated according to Garnsey et al. (1987).

4.4.3.2. Effect of RB-UY1 on the biological performance of *P. trifoliata*

To evaluate the biological response of *P. trifoliata* seedlings, ML, and navel orange grafted onto *P. trifoliata*, five plants of each combination were infected with RB-UY1 by graft-inoculation, and another set of each combination remained virus-free as a control. CTV infection was confirmed by DAS-ELISA and real-time RT-PCR (Bertolini et al., 2008). Growth variables such as height, stem diameter (at 10 cm from the ground), and leaf area (in five leaves per plant, using an LI-3100 Leaf Area Meter) were evaluated every 6 months, and plants were monitored for CTV symptoms. Analysis of variance and least significant difference (Tukey) analysis were performed using InfoStat software.

4.4.3.3. Efficiency of transmission of RB-UY1 by *T. citricida*

Experiments were performed in an insect-proof glasshouse under controlled conditions (20 to 24°C) as described by Hernández-Rodríguez et al. (2019). Specimens of *T. citricida* were used as vectors. ML plants inoculated with RB-UY1, TR7 (mild isolate), or I58.3 (severe isolate) were used as CTV sources, and ML seedlings (2 to 6 months old) were used as receptor plants. Two experiments were carried out with RB-

UY1 and TR7 isolates on 6- and 2-month-old ML seedlings. Then, two more experiments were performed, using I58 and RB-UY1 isolates on 2-month-old ML seedlings. CTV infection was confirmed every four months by DAS-ELISA throughout the course of the experiment. Transmission efficiency was expressed as the ratio of the number of CTV-positive seedlings to the number of inoculated seedlings.

4.5. Results

4.5.1. Molecular characterization

The complete genome sequence was determined and submitted to the GenBank database with the accession number OP448604. The full-length sequence is 19,175 nucleotides (nt) in length and is 98% identical to those of isolates NZRB-M12 (FJ525431) and NZRB-TH28 (FJ525433) from New Zealand and isolate B389-4 (MH051718.1) from South Africa. Phylogenetic analysis grouped the RB-UY1 isolate within the RB1 subclade (Fig. 1).

In order to better characterize the RB-UY1 isolate, sequence comparisons were performed with the RB1 clade sequence NZRB-M12 (FJ525431), the Uruguayan RB2 clade sequence DSST-17 (MH186146), and another RB2 clade sequence, B390-5 (KU883265). As observed in the phylogenetic analysis, the sequence of the RB-UY1 isolate was more similar to that of the RB1 clade isolate NZRB-M12 than to the RB2 sequences (Table 2). The sequence similarity of RB-UY1 to other RB sequences in the p27 gene was lower than in the other genes, and therefore, recombination analysis was performed. A sequence similarity plot indicated putative recombination events at nt positions 12,700, 14,450, 15,250, and 16,500 (Fig. 2A). BootScan analysis suggested that RB-UY1 is an RB-T3-RB-T3-RB recombinant (Fig. 2B).

Table 2. Similarity matrix of RB-UY1, NZRB-M12 (FJ525431), DSST-17 (MH186146), and B390-5 (KU883265) in p20, p23, p25, p27 and p61 genes/proteins.

Sequence	RB-UY1 nt ^a						RB-UY1 aa ^b				
	Complete genome	p20	p23	p25	p27	p61	p20	p23	p25	p27	p61
FJ525431-NZRB-M12	0.977	1.000	0.936	0.988	0.885	0.967	1.000	NA	0.991	0.954	0.960
KU883265-B390-5	0.933	0.894	0.849	0.928	0.874	0.935	0.950	NA	0.968	0.958	0.936
MH186146-DSST-17	0.932	0.894	0.852	0.931	0.872	0.931	0.945	NA	0.968	0.954	0.934

^a: nt= nucleotides, ^b: aa= amino acids, NA= not analyzed

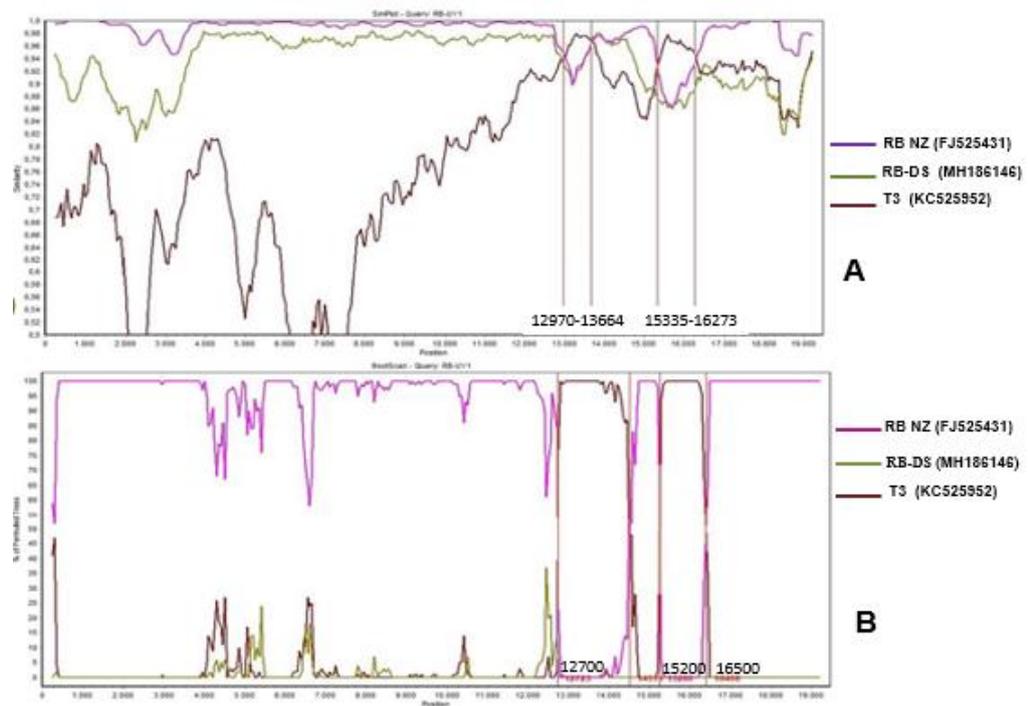


Fig.2 Recombination analysis for RB-UY1 genome. RB-UY1 was used as query, and a T3 strain (KC525952), a RB strain (FJ525431) and the other Uruguayan RB strain (MH186146) as probable parental strain. A) SimPlot analysis was performed with a window of 500bp, steps of 50bp and Kimura 2-parameter model. B) BootScan analysis was performed with a window of 500bp, steps of 50bp, the Kimura 2-parameter model, and 100 replicates parameters. In both panels, the probable recombination sites are indicated by red lines.

4.5.2. Biological characterization of RB-UY1

4.5.2.1 Biological characterization of RB-UY1 on indicator plants

Biological indexing showed that isolate RB-UY1 induced mild symptoms such as vein clearing and leaf cupping only on ML, in contrast to severe reference isolates, which induced stunting and seedling yellows in SO and DG, and stem pitting in SW (Table 3, Fig. 3). According to the group differentiation method proposed by Garnsey et al. (2005), the biological profile of this isolate corresponds to group 1 (symptoms only in ML).

Table 3. Type and severity of symptoms induced by RB-UY1 isolate and other CTV Uruguayan reference isolates on indicator reference plants. ML: Mexican lime; SO: Sour orange; DG: Duncan grapefruit; SW: Sweet orange. Symptoms reference: VC: vein clearing; LC: leaf cupping; Vck: vein corking; ST: stunting; SY: seedling yellows; SP: stem pitting; -, no symptoms; +, mild symptoms; ++, moderate symptoms; +++, severe symptoms.

Isolate	Type and severity of symptoms in indicator plants										
	ML				SO		DG			SW	
	VC	LC	Vck	SP	ST	SY	ST	SY	SP	SP	
RB-UY1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
TR7-18	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DSST-25	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
I58-5	++	+	+	+++	+	-	++	-	-	-	
I58-10	++	+	-	+++	++	-	-	-	-	-	
I58-26	++	++	+	+++	+++	+++	++	-	-	+	
UY-10	+++	++	-	+++	++	-	++	-	-	+	
UY-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Fig. 3. Symptoms induced by isolate RB-UY1 (a) and Uruguayan CTV reference isolates (b, c, d, e, and f) on indicator plants. (a,b) Mild and moderate vein clearing (VC) in ML. (c) Leaf cupping (LC) in ML. (d) Moderate vein corking (Vck) in ML. (e) Seedling yellows in SO. (f) Stem pitting in ML and SW.

4.5.2.2. Effect of RB-UY1 on the biological performance of *P. trifoliata*

Mechanical inoculation of *P. trifoliata* with the RB-UY1 isolate resulted in a slow replication rate (determined by real-time PCR), giving rise to 46% and 80% of seedlings being infected 10 and 14 months after inoculation, respectively (Table 4). Despite the slow replication rate, RB-UY1 was detected in the grafted scions (ML and navel orange) four months after being detected in the rootstock. Regarding symptoms, RB-UY1 induced only vein clearing in ML/*P. trifoliata*, whereas *P. trifoliata* seedlings or navel/*P. trifoliata* plants did not show any symptoms. However, RB-UY1 affected the growth of *P. trifoliata* seedlings and ML/*P. trifoliata* plants 4 years after inoculation, resulting in a significantly lower height, stem diameter, and leaf area than

the control (Table 5). On the other hand, in navel/*P. trifoliata* plants, growth was not affected by RB-UY1.

Table 4. Time until detection of RB-UY1 by ELISA and real-time PCR after mechanical inoculation in *P. trifoliata* seedlings, ML/*P. trifoliata* and Navel/*P. trifoliata* plants.

Plants	ELISA test				Real time PCR				
	N° Inoculated months post-inoculation RB-UY1				months post-inoculation RB-UY1				
	Plants	2m	5m	10m	15m	10m	14m	23m	34 m
<i>P. trifoliata</i>	5			1	1	1	5	5	5
ML/ <i>P. trifoliata</i>	5				2	4	5	5	5
Navel/ <i>P. trifoliata</i>	5				1	2	3	3*	4
% plants with RB-UY1		0	0	6.6	26.6	46.6	80	86.6	100

Table 5. Effects of isolate RB-UY1 on growth of *P. trifoliata*, ML/*P. trifoliata*, and Navel/*P. trifoliata* over 4 years post-inoculation.

Plant and Treatment ^a	Diameter stem (cm) ^b				Plant height (cm) ^b				Leaf area (cm ²) ^c		
	years post-inoculation				years post-inoculation				years post-inoculation		
	1	2	3	4	1	2	3	4	2	3	4
<i>P. trifoliata</i>	0.68a	1.04a	1.14a	1.28a	46a	126a	46a	93a	7.47a	9.96a	9.0a
<i>P. trifoliata</i> +RB-UY1	0.70a	0.86b	1.02a	1.16b	43a	103a	43a	70b	6.99a	8.37a	6.2b
ML/ <i>P. trifoliata</i>	0.68a	1.22a	1.38a	1.5a	62a	145a	62a	76a	11.34a	18.99a	16.5a
ML/ <i>P. trif.</i> +RB-UY1	0.68a	1.0a	1.28a	1.4a	44a	112a	44a	54b	10.35a	17.56a	11.6b
Navel/ <i>P. trifoliata</i>	0.68a	0.93a	1.30a	1.5a	43a	94a	43a	47a	33.54a	30.72a	32.2a
Navel/ <i>P. trif.</i> +RB-UY1	0.68a	0.85a	1.17a	1.6a	48a	63a	48a	50a	23.75a	29.41a	32.6a

Means with the same letter in the same column for the genotype combination are not significantly different ($p > 0.05$).

^a Treatment: *P. trifoliata*, Mexican lime and Navel orange grafted onto *P. trifoliata* plants inoculated with RB-UY1 and uninoculated controls.

^b Data are the mean for five plants per treatment.

^c Data are the mean for five leaves per plant and five plants per treatment.

4.5.2.3. Efficiency of transmission of RB-UY1 by *T. citricida*

The rate of CTV transmission by *T. citricida* varied between 7 and 33%. The RB-UY1 and I58 isolates were transmitted with medium-high efficiency in all of the experiments, while TR7 was never transmitted (Table 6). CTV was detected by DAS-ELISA four months after inoculation, and the rate of detection (Table 6) did not

increase in subsequent tests. RB-UY1 induced vein-clearing symptoms 2 months post-inoculation, whereas isolate I58 induced vein clearing and, later, vein corking.

Table 6. Efficiency of transmission of the RB-UY1 isolate, the mild isolate TR7, and the severe isolate I58 by *T. citricida*.

Experiment	Inoculated seedlings/isolate	Positive seedlings		Transmission rate (%)		Experimental period (months)
		RB-UY1	TR7/I58 ^a	RB-UY1	TR7/I58 ^a	
1	15	1	0	6.6	0	19
2	22	4	0	18.2	0	21
3	10	3	1	30.0	10	11
4	18	4	6	22.2	33.3	10

a: Isolate TR7 used in experiments 1 and 2, and isolate I58 used in experiments 3 and 4.

4.6. Discussion

Phylogenetic analysis grouped the RB-UY1 isolate within the RB1 subclade, while the previously sequenced recombinant RB Uruguayan isolate DSST-17 (MH186146) (Benítez-Galeano et al., 2018) belongs to the RB2 group, showing that both RB subclades are present in Uruguay. In addition, both sequenced genotypes are recombinant, with RB-UY1 resulting from recombination with a T3 strain. These findings confirm the high genetic diversity of CTV in Uruguay (Benítez-Galeano et al., 2018; Rubio et al., 2019), which could be explained by the endemic distribution of CTV and *T. citricida*. California and South Africa have a similar situation, with circulation of both RB groups and evidence of recombination with other genotypes (Cook, 2019; Yokomi et al., 2017).

Despite the high prevalence of severe CTV isolates in the country, RB-UY1 has been biologically characterized as a mild isolate, since it induces mild VC and LC in ML, as has been observed with RB isolates from California and Puerto Rico (Roy et al., 2013; Yokomi et al., 2017). However, more-severe RB isolates have also been reported. In China, these can induce mild stem pitting on ML, DG, and SW (Wang et al., 2019), while in South Africa, they were able to induce mild or moderate stem pitting in grapefruit (Cook et al., 2016).

Bioassays on *P. trifoliata* seedlings, ML/*P. trifoliata*, and navel/*P. trifoliata* plants revealed a slow replication rate of RB-UY1 on *P. trifoliata*. According to Harper et al. (2010), the viral titer of RB isolates in *P. trifoliata* is lower and shows a slower rate of accumulation and translocation than in *Citrus sinensis*, probably due to the resistance expressed by the rootstock. Nevertheless, RB-UY1 was able to move upward from the rootstock to the scion (ML and navel orange) quickly. Once detected in the rootstock, it took 4 months to be detected in the scion. However, this isolate did not induce symptoms in N/*P. trifoliata* plants or *P. trifoliata* seedlings, in agreement with the results reported by Roy et al. (2013). This confirms that RB-UY1 is a mild isolate that is able to generate symptoms only in ML, the most susceptible indicator plant for CTV. In general, RB isolates cause a systemic but asymptomatic infection in *P. trifoliata* (Harper et al., 2010), but some RB isolates are able to induce mild to moderate stem pitting on this rootstock (Cook et al., 2016; Dawson and Money, 2000).

Although RB-UY1 is a mild isolate, some growth parameters (height, stem diameter, and leaf area) were significantly affected in *P. trifoliata* seedlings and ML/*P. trifoliata* plants 4 years after inoculation. This effect seems to be dependent on the scion genotype, since no growth reduction was observed in navel orange. In South Africa, RB strains have been found to induce stem pitting in grapefruit, and, although they reach a high viral titer, field trials have demonstrated that these isolates do not negatively influence the performance of the trees (Cook et al., 2016).

The transmission efficiency of RB-UY1 by *T. citricida* is variable (7 to 30%) and may be affected by several factors, such as the virus isolate, the aphid species, the number of aphids used, the donor and receptor plants used, and the environmental conditions (Harper, 2013; Harper et al., 2018; Yokomi et al., 2010). In this regard, in our first experiment, the low transmission rate could be related to the age of the receptor plant and the biological properties of the CTV isolate. By using younger seedlings and a severe isolate (I58) in the subsequent experiments, the transmission rate was increased significantly. The RB-UY1 isolate was transmitted with medium or high efficiency by *T. citricida* according to the classification of Yokomi et al. (2010). In general, severe CTV isolates have high transmissibility (Yokomi et al., 2010; Zhou et al., 2011). However, RB-UY1, with the biological characteristics of a mild isolate,

was as efficiently transmitted as the severe isolate I58. Harper (2013) has suggested that transmission efficiency could be influenced by co-evolution of the vector species and the CTV strains that circulate in each region. In Uruguay, the virus and the vector have been circulating for several decades in citrus crop grafted on trifoliolate rootstocks. These conditions might have influenced the co-evolution of RB-UY1 and its vector, resulting in a high rate of transmission. It has also been reported that nucleotide sequence variations in some genes (as p61 and p65) can affect transmission by aphids independently of virus accumulation (Cook, 2019; Harper et al., 2016). Such polymorphisms might also have played a role in the differences in transmission rates observed in this study.

4.7. References

- Albiach-Marti, M., Grosser, J., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S. & Dawson, W. (2004). *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding*, 14, 117–128. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000038000.51218.a7>
- Arruabarrena, A., Benítez-Galeano, M.J., Giambiasi, M., Bertalmío, A., Colina, R. & Hernández-Rodríguez, L. (2016). Application of a simple and affordable protocol for isolating plant total nucleic acids for RNA and DNA virus detection. *Journal Virology Methods*, 237, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.011>
- Benítez-Galeano, M., Vallet, T., Carrau, L., Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Rivas, F., Rubio, L., Maeso, D., Vignuzzi, M., Moratorio, G. & Colina, R. (2018). Complete genome sequence of a novel recombinant *Citrus tristeza virus*: a resistance breaking isolate from Uruguay. *Genome Announcement*, 6, e00442–e00418. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00442-18104>
- Benítez-Galeano, M., Hernández-Rodríguez, L., Dalmao, F., Bertoni, E., Bertalmío, A., Rubio, L., Rivas, F., Maeso, D. & Colina, R. (2021). First comprehensive sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay. *Journal Citrus Pathology*, 8(1). <https://doi.org/10.5070/C481049181>

- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., et al. (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal Plant Pathology*, 120, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9206-9>
- Cook, G., van Vuuren, S.P., Breytenbach, H.J., Steyn, C., Burger, J.T. & Maree, H.J. (2016). Characterization of *Citrus tristeza virus* Single-Variant Sources in Grapefruit in Greenhouse and Field Trials. *Plant Disease*, 100(11), 2251–2256. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0391-RE>
- Cook, G. (2019). Characterization of *Citrus tristeza virus* variants and their influence on symptom expression in grapefruit. Thesis (PhDAgric). Stellenbosch University. 121p <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/105724>
- Dawson, T. E. & Mooney, P. A. (2000). Evidence for Trifoliolate Resistance Breaking Isolates of *Citrus Tristeza Virus* in New Zealand. In International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010) (Vol. 14, No. 14). <http://dx.doi.org/10.5070/C59X93B3DR>
- Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M. & Moreno, P. (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 137–55. <https://doi.org/10.1146/annurevphyto-080614-120012>
- Francis, M., Peyrou, M., Perea, B., Borde, J. & Fosali, Y. (1997). Caracterización de aislamientos del virus de la Tristeza de los cítricos (CTV) que causan pérdidas en pomelo injertado sobre Trifolia en Uruguay. IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología.10/97. Montevideo, Uruguay.
- Garnsey, S., Gumpf, D., Roistacher, C., Civerolo, E., Lee, R., Yokomi, R. & Bar-Joseph, M. (1987). Toward standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*, 19, 151–157. https://hdl.handle.net/10520/AJA03701263_997
- Garnsey, M., Civerolo, E., Gumpf, D., Paul, C., Hilf, M., Lee, R., Brlansky, R., Yokomi, R. & Hartung, J. (2005). Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. In: Hilf M, Duran-Vila N, Rocha-Peña M (eds) Proceedings of the 16th conference of International

- Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA. 75–93.
<https://doi.org/10.5070/C53nj1r1gt>
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Harper, S., Dawson, T. & Pearson, M. (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, 155, 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0604-5>
- Harper, S. (2013). *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers of Microbiology*, 4(93), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>
- Harper, S.J., Killiny, N., Tatineni, S. et al (2016). Sequence variation in two genes determines the efficacy of transmission of *Citrus tristeza virus* by the brown citrus aphid. *Archives of Virology*, 161, 3555–3559.
<https://doi.org/10.1007/s00705-016-3070-x>
- Harper, S., Cowell, S. & Dawson, W. (2018). Bottlenecks and complementation in the aphid transmission of *Citrus tristeza virus* populations. *Archives of Virology*, 163, 3373–3376. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4009-1>
- Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Arruabarrena, A., Rubio, L., Rivas, F., Benítez-Galeano, M.J., Colina, R. & Maeso, D. (2017). First report of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in ‘Newhall’ sweet Orange in South America. *Plant Disease*, 101, 1063.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0430-PDN>
- Hernández-Rodríguez, L., Benítez-Galeano, M.J., Bertalmío, A., Rubio, L., Rivas, F., Arruabarrena, A., Rolón, R., Colina, R. & Maeso, D. (2019). Diversity of Uruguayan *Citrus tristeza virus* populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology*, 44, 352–362.
<https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>
- Lole, K.S., Bollinger, R.C., Paranjape, R.S., Gadkari, D., Kulkarni, S.S, Novak, G., Ingersoll, R., Sheppard, H.W. & Ray, S.C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters

- in India, with evidence of intersubtype recombination. *Journal of Virology*, 73(1), 152–160. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.1.152-160>
- Matos, L., Hilf, M., Cayetano, X., Feliz, A., Harper, & Folimonova, S. (2013). Dramatic change in *Citrus tristeza virus* populations in the Dominican Republic. *Plant Disease*, 97(3): 339–345. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0421-RE>. PMID: 30722356
- Melzer, M.J., Borth, W.B., Sether, D.M., Ferreira, S., Gonsalves, D. & Hu, J.S. (2010). Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes*, 40(1), 111–118. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0409-3>
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. & Peña, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251–68. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>
- Roistacher, C. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome, pp 17–25
- Roistacher, C., da Graça, J. & Müller, G. (2010). Cross-protection against *Citrus Tristeza Virus* a review. In: Brlansky R, Lee R, Timmer L (eds) Proceedings of the 17th conference of the International Organization of Citrus Virologists. IOCV, Riverside, CA, 1–27. <https://escholarship.org/uc/item/73v0t59c>. <https://doi.org/10.5070/C573v0t59c>
- Roy, A., Choudhary, N., Hartung, J. & Brlansky, R. (2013). The prevalence of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Disease*, 97, 1227–1234. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0012-RE>.
- Rubio, L., Bertalmío, A., Hernández-Rodríguez, L., Benítez Galeano, M.J., Arruabarrena, A., Rivas, F., Colina, R. & Maeso, D. (2019). Biological and molecular characterization of Uruguayan *Citrus tristeza virus* field isolates. *Journal Plant Pathology*, 101, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0149-0>

- Scott, K., Hlela, Q., Zablocki, O., Read, D., van Vuuren, S., & Pietersen, G. (2013). Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting *Citrus tristeza virus* strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Archives of Virology*, *158* (1), 27–37. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1450-4>. PMID: 22932923
- Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, *10*(3), 512 – 26. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>. PMID: 8336541
- Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, *38*(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Yokomi, R., Polek, M. & Gumpf, D. (2010). Transmission and spread of *Citrus tristeza virus* in central California. In: Karasev A, Hilf M (eds) *Citrus tristeza virus* complex and tristeza diseases. APS Press, St. Paul, USA, pp 151–165
- Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Chiumenti, M. & Hajeri, S. (2017). Identification and characterization of *Citrus tristeza virus* isolates breaking resistance in trifoliolate orange in California. *Phytopathology*, *107*, 901–908. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0007-R>
- Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Chiumenti, M., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Weng, Z., Xiong, Z. & Hajeri, S. (2018). Molecular and biological characterization of a novel mild strain of *Citrus tristeza virus* in California. *Archives of Virology*, *163*(7), 1795–1804. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3799-5>. PMID: 29550931
- Wang, J., Zhou, T., Cao, M., Zhou, Y. & Li, Z. (2019). First report of *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in *Citrus grandis* in China. *Journal Plant Pathology*, *101*(2), 451. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0169-9>
- Wang, J., Zhou, T., Shen, P., et al. (2020). Complete genome sequences of two novel genotypes of *Citrus tristeza virus* infecting *Poncirus trifoliata* in China. *Journal Plant Pathology*, *102*, 903–907. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00535-0>

Zhou, Y., Zhou, C., Wang, X., Liu, Y., Liu, K., Zou, Q., Xiang, Y. & Li, Z. (2011). Influence of the quantity and variability of *Citrus tristeza virus* on transmissibility by single *Toxoptera citricida*. *Journal Plant Pathology*, 93, 97–103. <https://doi.org/10.4454/jpp.v93i1.278>

5. Physiological response of *Poncirus trifoliata* rootstock to infection by an RB isolate of *Citrus tristeza virus**

5.1. Resumen

En las zonas productoras de cítricos donde el virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es endémico, *Poncirus trifoliata* es usado como portainjerto para evitar el declinamiento de los árboles. Sin embargo, aislados de CTV que quiebran la resistencia (RB), capaces de infectar sistémicamente a *P. trifoliata*, han sido identificados. No obstante, sus efectos sobre el portainjerto han sido poco estudiados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta fisiológica de *P. trifoliata* a la infección por un aislado RB local (RB-UY1) y determinar sus efectos sobre la variedad, utilizando naranja navel (N/*P. trifoliata*) y lima Mexicana (ML/*P. trifoliata*) como modelos. Parámetros de crecimiento, expresión de síntomas, actividad fotosintética y estrés oxidativo fueron registrados periódicamente. Los resultados mostraron que la actividad fotosintética no fue afectada por el aislado RB-UY1 en *P. trifoliata* ni en las especies injertadas. No se detectó daño oxidativo, a pesar de observar mayores niveles de radicales peróxido de hidrógeno y superóxido en plantas RB-UY1 inoculadas. Sin embargo, una reducción de crecimiento fue registrada en *P. trifoliata* y ML/*P. trifoliata*, pero no en N/*P. trifoliata*. En respuesta a la infección por RB-UY1, hubo un aumento significativo en el contenido total de fenoles en el portainjerto y N/*P. trifoliata*, aunque no hubo diferencias en la actividad enzimática de catalasa y ascorbato peroxidasa. En conclusión, la infección por el aislado RB-UY1 afectó, con el tiempo, el crecimiento del portainjerto, pero no comprometió el desempeño fisiológico de la variedad en plantas de N/*P. trifoliata*. Estos hallazgos demuestran una clara interacción huésped-aislado viral y subrayan la necesidad de realizar más estudios para dilucidar los mecanismos subyacentes de la respuesta del huésped a los aislados RB-CTV.

Palabras clave: *Citrus*, CTV, fotosíntesis, parámetros de crecimiento, aislados que quiebran la resistencia

*Artículo publicado en *Agrociencia* (2025), 29 e1636

<https://doi.org/10.31285/AGRO.29.1636>

5.2. Summary

In citrus growing areas where *Citrus tristeza virus* (CTV) is endemic, *Poncirus trifoliata* is commonly used as a rootstock to prevent tree decline. However, resistance breaking (RB) CTV isolates, capable of systemically infecting *P. trifoliata* have been identified. Nevertheless, their effects on the rootstock remain understudied. Therefore, the aim of this work was to evaluate the physiological response of *P. trifoliata* to infection by a local RB isolate (RB-UY1), and determine its effects on grafted scions, using Navel orange (N/*P. trifoliata*) and Mexican lime (ML/*P. trifoliata*) as models. Growth parameters, symptoms expression, photosynthetic activity and oxidative stress were periodically recorded. The results showed that the photosynthetic activity was not affected by the RB-UY1 isolate in *P. trifoliata* nor in grafted scions. Oxidative damage was not detected in any treatment, despite higher levels of hydrogen peroxide and superoxide radicals in RB-UY1 inoculated plants. Nonetheless, a decline in growth was recorded in *P. trifoliata* and ML/*P. trifoliata*, but not in N/*P. trifoliata*. In response to the RB-UY1 infection, there was a significant increase in total phenol concentration in the rootstock and N/*P. trifoliata*, however, enzyme activity of catalase and ascorbate peroxidase did not differ among treatments. In conclusion, infection by the RB-UY1 isolate affected growth rootstock over time, but did not compromise the physiological performance of N/*P. trifoliata* scion. These finding demonstrates a clear host-viral isolate interaction and underscore the need for further studies to elucidate the underlying mechanisms of the host response to RB-CTV isolates.

Keywords: *Citrus*, CTV, growth parameters, photosynthesis, resistance breaking isolates

5.3. Introduction

Citrus tristeza virus (CTV) is a major pathogen affecting citrus crops, responsible for the death of millions of citrus plants worldwide in the mid-20th century and still limiting citrus production in certain regions (Moreno et al., 2008; Dawson et al., 2015). CTV belongs to the genus *Closterovirus* (family *Closteroviridae*), and possesses a single-stranded, positive-sense RNA genome (Karasev et al., 1995). It is a phloem-limited pathogen of *Rutaceae* family, mainly of the genus *Citrus*. Infected plants may remain asymptomatic or exhibit a wide range of symptoms, depending on the CTV genotype isolate, rootstock-cultivar combination and environmental conditions (Moreno et al., 2008). CTV induces three major syndromes: decline, stem pitting and seedling yellows (Dawson et al., 2015).

Disease management strategies include the use of certified nursery plants, cross-protection programs and use of tristeza-tolerant rootstocks (Moreno et al., 2008; Folimonova et al., 2020; Folimonova and Sun, 2022). In Uruguay, as in other citrus growing areas where CTV is endemic, a high proportion of citrus plants are grafted onto *P. trifoliata* and its hybrids, which confer resistance to CTV decline (Moreno et al., 2008). However, isolates capable of replicating and systemically infecting trifoliolate rootstocks have been identified (Albiach-Martí et al., 2004; Harper, 2010; Yokomi et al., 2017) and classified as resistance-breaking (RB) strains. Although numerous RB isolates have been reported worldwide (Roy et al., 2013; Scott et al., 2013; Hernández-Rodríguez et al., 2017; Wang et al., 2019), limited information is available regarding the physiological response of *P. trifoliata* and grafted scions to RB infection.

Viruses often affect structural and biochemical processes involved in the photosynthetic pathway, disrupting chloroplast function, altering enzymes activity, and affecting carbohydrate metabolism and transport (Hull, 2014; Jiang and Zhou, 2023), giving rise to an increase in reactive oxygen species (ROS) production, cellular damage, and symptoms such as leaf chlorosis, impaired growth or even plant death (Dawson et al., 2013; Dória et al., 2015; Jiang and Zhou, 2023). In this infection process, numerous host metabolic responses are triggered, and enzymatic and non-enzymatic defense mechanisms can be activated. In *Citrus*, some of these mechanisms

have been reported, such as synthesis of antioxidant enzymes (i.e., ascorbate peroxidase, catalase, among others; Arbona et al., 2003; Rivas et al., 2008), synthesis of pathogen-related proteins (van Loon et al., 2006) or activation of the xanthophyll cycle (Rivas et al., 2011).

CTV induces a wide range of physiological and biochemical responses in their hosts (Dawson et al., 2013). Reduction in photosynthetic activity, changes in gene expression and protein profile have been reported in Mexican lime (*Citrus aurantifolia*), regardless of the severity of the isolate (Pérez-Clemente et al., 2015). Activation of defense mechanisms has been observed, with non-enzymatic (total flavonoids, ascorbic acid, phenolic acid) and enzymatic antioxidants (catalase, superoxide dismutase and peroxidase) showing increased activity (Dória et al., 2015). However, despite these responses, oxidative damage has also been observed (Pérez-Clemente et al., 2015).

The objective of this study was to evaluate the physiological response of *P. trifoliata* to infection with an RB-CTV isolate and to determine its effects on grafted scions. To this end, two model species were used: navel orange (*Citrus sinensis*) and Mexican lime (*Citrus aurantifolia*). The findings of this study provide valuable insights for the use of *P. trifoliata* in citrus growing regions where CTV is endemic and RB strains have been reported.

5.4. Materials and methods

5.4.1. Virus isolate, plant material and experimental conditions

The isolate RB-UY1 was obtained from a field isolate in Uruguay. Its RB phenotype was confirmed by inoculation and multiplication in *P. trifoliata* (Hernández-Rodríguez et al., 2017) and its genome was then sequenced by the Sanger method (GenBank accession number OP448604). RB-UY1 was maintained on *P. trifoliata* seedlings in an insect-proof greenhouse according to standard procedures (Roistacher, 1991).

The physiological response induced by the RB-UY1 isolate was evaluated in three models: a) *P. trifoliata* seedlings; b) Mexican lime (ML; *Citrus aurantifolia*)

grafted onto *P. trifoliata*; and c) Navel orange (*Citrus sinensis*) grafted onto *P. trifoliata*. Five plants of each combination were inoculated with RB-UY1 isolate, while another set (five plants) of uninoculated combinations remained as control.

CTV infection was confirmed by real-time RT-PCR according to the protocol described by Bertolini et al. (2008). The experiment was conducted in an insect-proof and temperature-controlled greenhouse (18-24 °C), for four years. The plants were kept in 5L pots and the substrate consisted of a mixture of peat and sand. Irrigation and fertilization were carried out according to standard horticultural practices, and the plants were pruned at the same size, once a year, in autumn. Rootstocks were guided to one single branch, while the varieties to three branches. All plants were placed randomly on the same table, inside the greenhouse.

All measurements were carried out at the same time, every six months, except when some treatments did not have sufficient foliage (example *P. trifoliata*), or for gas exchange parameters, which were measured once a year.

5.4.2. Plant growth parameters and CTV symptoms

Plant height was determined by measuring from the base of the plant to the pruning point and then adding the average of the measurements on the branches. For stem diameter determination, measurements were taken at 10 cm above the ground. Leaf area was determined in five randomly selected leaves per plant, using a LI-3100 leaf area meter (LICOR, USA). All growth parameters measurements were recorded per plant, and the average for each treatment was subsequently calculated. The presence of CTV visible symptoms such as vein clearing, leaf cupping, vein corking, stunting, and their severity were scored according to Garnsey et al. (1987), also stem pitting was evaluated at the end of experiment.

5.4.3. Chlorophyll fluorescence parameters

Leaf fluorescence parameters were assessed using an OS5p portable fluorometer (Opti-Sciences, USA) in all plants of each treatment, using three mature leaves per plant randomly selected. Chlorophyll fluorescence parameter F_v/F_m , which represents the maximum efficiency of photosystem II (*PSII*) photochemistry, was determined

following the procedures of van Kooten and Snell (1990) , using a modulated light pulse emission after a dark period of 30 min. Quantum yield (Φ_{PSII}) was measured in the same leaves after actinic light adaptation. Other variables such as minimum fluorescence (F_o), maximum fluorescence (F_m), maximum fluorescence under regular PAR (F_m') and non-photochemical quenching (NPQ) were analyzed to determine possible changes in different photosynthetic stages. Calculations and terminology were applied as in Kramer et al. (2004).

5.4.4. Chlorophyll index

Leaves chlorophyll content was determined using a Chlorophyll Meter SPAD 502 DLPlus (Spectrum Technologies, USA). Measurements on three mature leaves, from all plants in each treatment, were taken.

5.4.5. Gas exchange parameters

Leaf gas exchange parameters were measured with a CIRAS-3 portable gas analyzer (PP Systems, USA) under ambient CO₂ and humidity. Supplemental light was provided by a PAR lamp with a photon flux density of 1200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and air flow was set at 300 $\mu\text{mol s}^{-1}$. Measurements were taken on three mature leaves from all plants in each treatment. Net CO₂ assimilation rate (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ratio of intracellular to ambient CO₂ concentration (C_i/C_a), stomatal conductance (g_s , $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and transpiration rate (E) were evaluated. Leaf-to-air vapor pressure difference was calculated from cuvette air temperature, relative humidity and cuvette TL, assuming that leaf water was saturated at TL. C_i/C_a was calculated from leaf internal CO₂ partial pressure (C_i).

5.4.6. Determination of malondialdehyde (MDA), hydrogen peroxide and superoxide radicals in plant tissues

The concentration of malondialdehyde was determined following the method described by Dhindsa and Matowe (1981). Briefly, leaf tissue (250 mg) was ground with liquid nitrogen and homogenized in 0.1% trichloroacetic acid (TCA; Merck

KGaA), filtered and maintained on ice. The reaction was initiated by adding an equal volume of 0.1% thiobarbituric acid (TBA; Merck KGaA) prepared in 20% TCA. The mixture was incubated at 95°C for 30 min, followed by rapid cooling on ice and centrifugation. The supernatant was analyzed by spectrophotometry at 440, 534 and 600 nm, and the MDA concentration was calculated according to the formula proposed by the original authors.

To evaluate oxidative stress, the accumulation of hydrogen peroxide (H_2O_2) and superoxide radical (O_2^-) was assessed through histological staining, based on the methodology of Ramel et al. (2009) with some modifications. The presence of O_2^- was detected using thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT; Sigma, St. Louis), whereas H_2O_2 accumulation was visualized using 3, 3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma, St. Louis) staining. In both cases, leaf discs were incubated in the respective staining solutions for four hours in the dark. After incubation, the samples were subjected to a bleaching process in a mixture of acetic acid, glycerol, and ethanol (1/1/3) (v/v/v) at 100 °C, followed by preservation in a glycerol-ethanol solution. The stained tissues were subsequently photographed to document the distribution of reactive oxygen species. To quantify these compounds, the leaves were pulverized in liquid nitrogen, and the extracted pigments were solubilized in either DMSO for O_2^- detection or $HClO_4$ for hydrogen peroxide analysis. The absorbance of the solutions was then measured at 570 nm for O_2^- and 405 nm for H_2O_2 , using appropriate blanks for reference.

5.4.7 Determination of total phenol content and enzyme activity

The total phenolic content and enzyme activity were analyzed to assess the plant response to RB-UY1 infection at the end of the experiment. Phenolic compounds were quantified using the Folin-Ciocalteu reagent method (Sánchez-Rangel et al., 2013). In brief, lyophilized leaf samples (50mg) were extracted with methanol at 80%, homogenized and centrifuged. The supernatant was then mixed with the Folin-Ciocalteu reagent and incubated for 3 min. Finally, sodium carbonate was added and after incubation in darkness for 2 hours, absorbance was measured at 760 nm. A gallic

acid standard curve was constructed, and the total phenol content in the samples was calculated by extrapolation of absorbance values to the calibration curve.

To evaluate antioxidant enzyme activity, ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activities were measured using spectrophotometric assays. Enzyme extracts were obtained by homogenizing ground tissue (250 mg) in potassium phosphate buffer (100 mM, PH=7.5), followed by centrifugation. Protein concentration in the extracts was determined according to Bradford (1976), using bovine serum albumin (Sigma-Aldrich) as the standard. CAT activity was determined by quantifying the decrease in absorbance at 240 nm ($E = 39.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The reaction mixture included the plant extract, potassium phosphate buffer (100mM), and H_2O_2 (100mM, Sigma-Aldrich). The reaction was initiated by adding H_2O_2 (Rao et al., 1996) and the absorbance was recorded at one-minute intervals over 4 minutes. APX activity was evaluated by monitoring the decrease in absorbance at 290 nm ($E = 2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a reaction mixture containing plant extract, potassium phosphate buffer (100mM), ascorbic acid (0.5mM, Sigma-Aldrich) and H_2O_2 (4mM, Sigma-Aldrich). Absorbance values were recorded at 2 and 5 minutes (Nakano and Asada, 1981).

5.4.8. Statistical analysis

Data were processed using R software, version 4.2.3. Data normality was analyzed by Shapiro-Wilk test. According to this, data were processed by mixed linear model. The means of the different variables were compared between treatments (control vs. inoculated plants, in each model plants); least significant difference was determined by Tukey test at $p \leq 0.05$.

5.5. Results

5.1.1. Plant growth and CTV symptoms

The presence of the virus was confirmed in inoculated plants approximately one year after inoculation by real-time RT-PCR. Consequently, this time point was considered as the baseline for infection in the data analysis. Regarding growth variables, plant height and leaf area were significantly reduced in RB-inoculated *P.*

trifoliata and ML/*P. trifoliata* plants compared to control plants, 48 months post-inoculation. In contrast, the growth in RB-inoculated N/*P. trifoliata* plants remained unaffected by virus infection, although a slight initial growth restriction was observed, the difference was not statistically significant compared to the control plants (Fig.1). Foliar symptoms associated with CTV were observed exclusively in ML/*P. trifoliata* plants, which exhibited mild vein clearing and leaf cupping, both classified as mild symptoms of the disease. However, by the end of the experimental period, RB-inoculated *P. trifoliata* plants showed mild to moderate stem pitting (Fig.2).

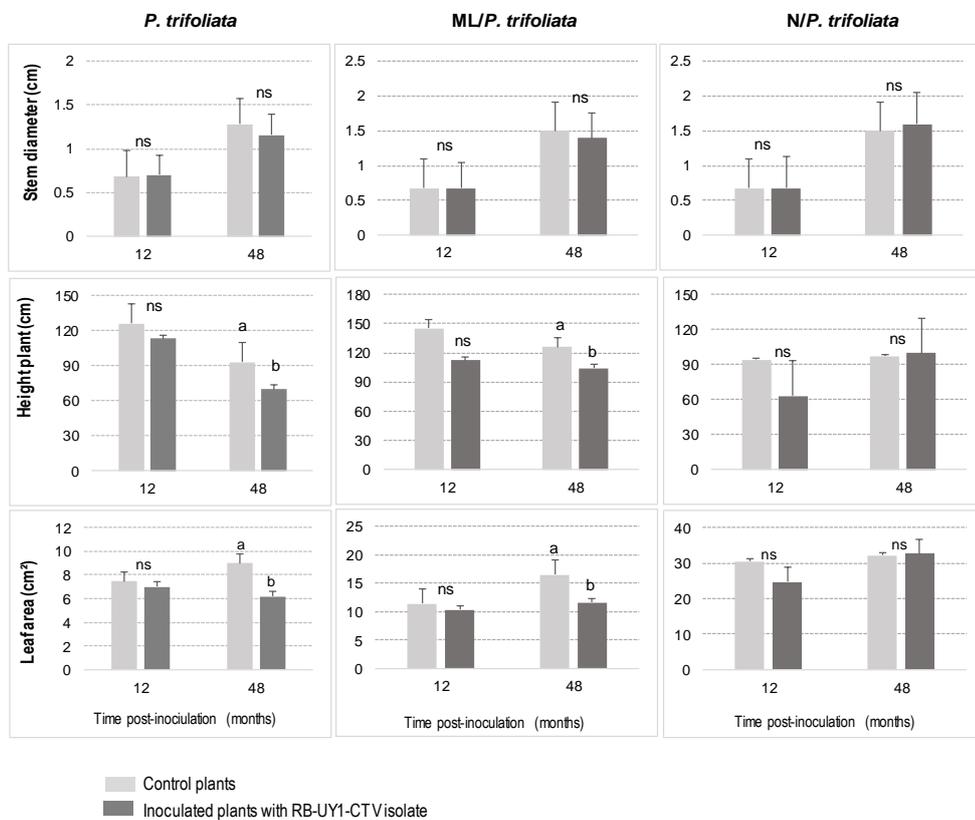


Fig.1 Growth parameters evaluated in *P. trifoliata* seedlings, ML/*P. trifoliata* and N/*P. trifoliata* at 12 and 48 months post-inoculation with RB-UY1-CTV isolate. Parameters: Stem diameter (cm), Height seedling (cm) and Leaf area (cm²/leaf). Data are mean values of five independent measures and twenty-five leaves in each treatment \pm standard error. Different letters denote significant differences at $P \leq 0.05$; ns: not significant differences.



Fig.2 Symptoms produced by RB-UY1-CTV isolate, A: mild vein clearing in ML/*P. trifoliata*; B: leaf cupping in ML/*P. trifoliata*, C: left: healthy stem of *P. trifoliata* non-inoculated control plant, right: stem pitting induced by RB-UY1-CTV isolate in *P. trifoliata*.

5.5.2. Chlorophyll fluorescence parameters

The maximum fluorescence yield in dark-adapted leaves (F_v/F_m) remained stable at approximately 0.8 in all treatments throughout the experiment, regardless of plant species or virus infection (Fig.3; 1A, 1B, 1C). Similarly, the quantum yield efficiency in light-adapted leaves (Φ_{PSII}) was not affected (Fig.3; 2A, 2C, 2B). Despite of this, a slight decreasing trend was observed for this parameter in RB-inoculated ML/*P. trifoliata* plants by the third year post-inoculation.

5.5.3. Chlorophyll index

This parameter showed a slight tendency to decrease in RB-inoculated plants, and was significantly lower in ML/*P. trifoliata* and N/*P. trifoliata* plants at the last assessment (Fig.3; 3A, 3B, 3C).

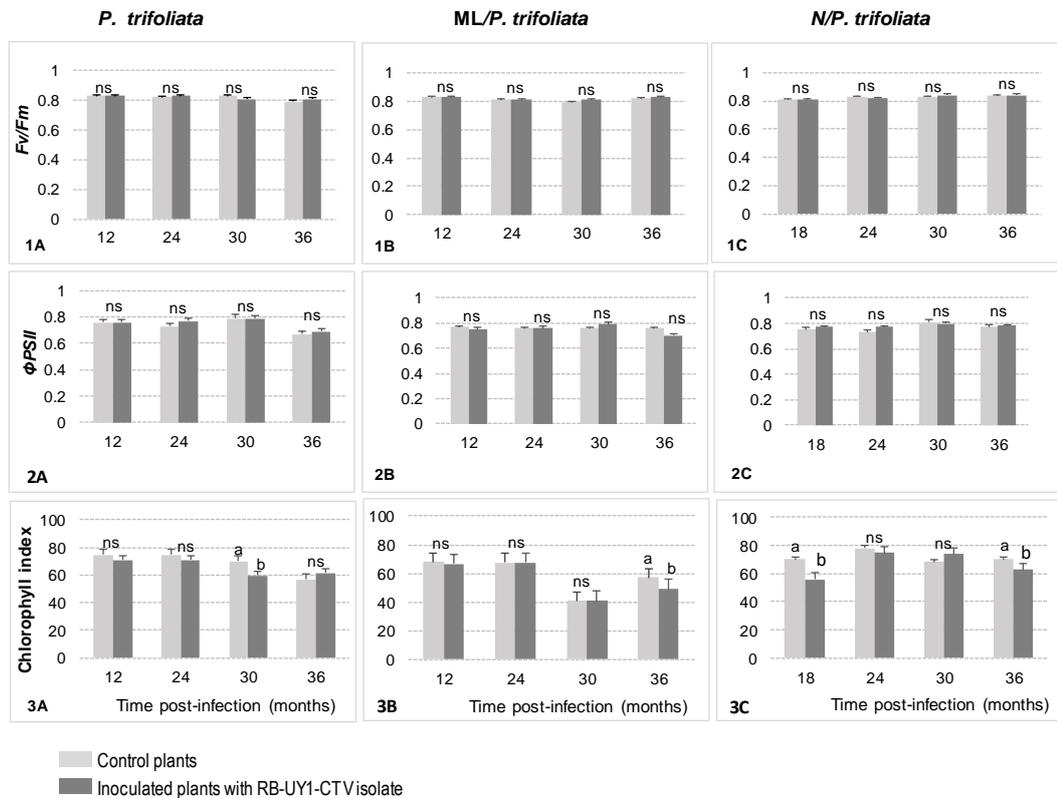


Fig.3. Evaluation of chlorophyll fluorescence parameters and chlorophyll index in *P. trifoliata* seedlings (A), *ML/P. trifoliata* (B) and *N/P. trifoliata* (C) post-infection with RB-UY1-CTV isolate. Parameters: 1- Maximum fluorescence yield in dark-adapted leaves (F_v/F_m); 2- Quantum yield in light-adapted leaves (Φ_{PSII}). 3- Chlorophyll index. Data are the mean values of 15 independent measurements \pm standard error. Different letters (a, b) denote significant differences at $P \leq 0.05$; ns: not significant differences.

5.5.4. Gas exchange parameters

The leaf net assimilation rate (A) did not show significant differences between RB-inoculated and non-inoculated plants throughout the experimental period. The stomatal conductance (g_s) and C_i/C_a ratio were generally higher in RB-inoculated plants during the early stages of infection (up to 24 months), with *P. trifoliata* exhibiting the most pronounced response (Fig.4; 2A, 2B; 3A, 3B). Conversely, in RB-inoculated *N/P. trifoliata* plants, g_s and C_i/C_a ratio were lower during the first year post-inoculation (Fig. 4; 2C, 3C), but exhibited a similar trend to *P. trifoliata* and

ML/*P. trifoliata* at 24 months. By the end of the experiment, gas exchange variables showed no significant differences associated with the presence of the virus.

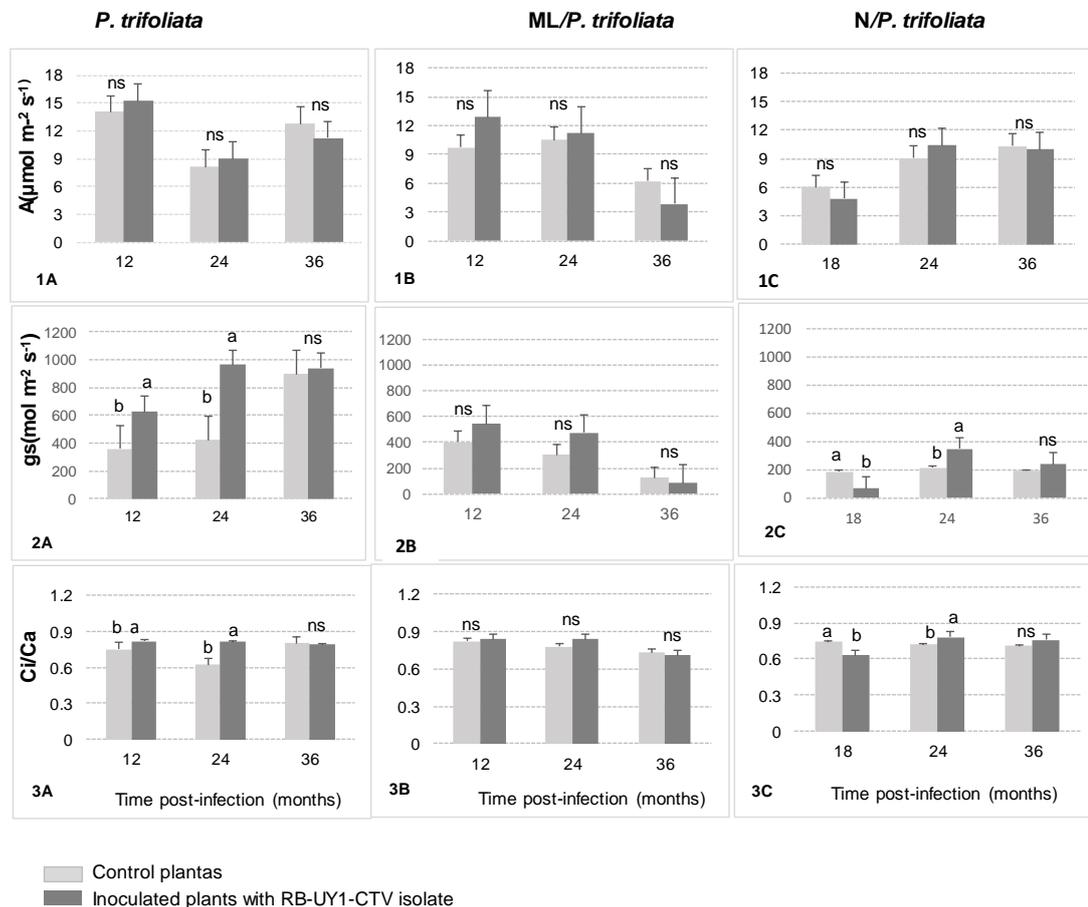


Fig.4. Evaluation of gas exchange parameters in *P. trifoliata* seedlings (A), ML/*P. trifoliata* (B) and N/*P. trifoliata* (C) post-infection with RB-UY1-CTV isolate. Parameters: 1- Leaf net CO₂ assimilation rate (A); 2-Stomatal conductance (gs); 3- Relation between intracellular and environmental CO₂ concentration (Ci/Ca). Data are mean values of 15 independent measurements ± standard error. Different letters (a, b) denote significant differences at P≤0.05; ns: not significant differences.

5.5.5. Oxidative damage and ROS in plant tissues

Oxidative damage in response to infection with the RB-UY1-CTV isolate was assessed by measuring MDA concentration in leaf tissue. No significant differences were observed in this parameter between inoculated and non-inoculated control plants

in any of the evaluated species (Fig. 5). Regarding H_2O_2 and O_2^- concentrations at the end of the experimental period, staining leaf tissues of RB-inoculated plants showed significantly higher absorbance values at 570 nm compared to control plants, indicating a higher concentration of the O_2^- radical. Additionally, RB-inoculated *N/P. trifoliata* plants exhibited higher absorbance at 405 nm than non-inoculated control plants, indicating a significantly higher H_2O_2 content (Fig. 6). However, these plants also showed staining in the cut area of the leaf tissue (picture in Fig. 6), likely the oxidative stress generated there may have also contributed to the increased radical levels.

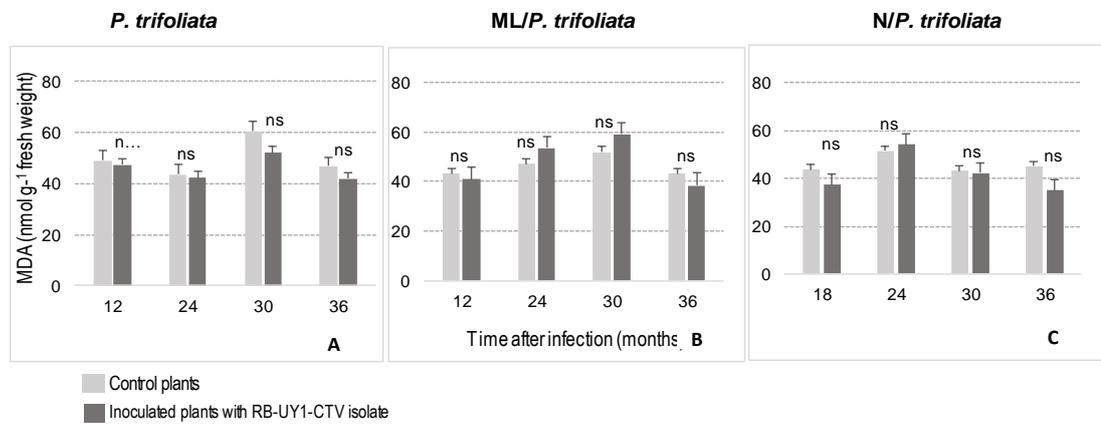


Fig.5. Oxidative damage in response to infection by the RB-UY1-CTV isolate assessed by Malondialdehyde (MDA) concentration in leaf tissue of *P. trifoliata* seedlings (A), *ML/P. trifoliata* (B) and *N/P. trifoliata* (C). Data are mean values of five replicates \pm standard error. ns denote not significant differences at $P \leq 0.05$.

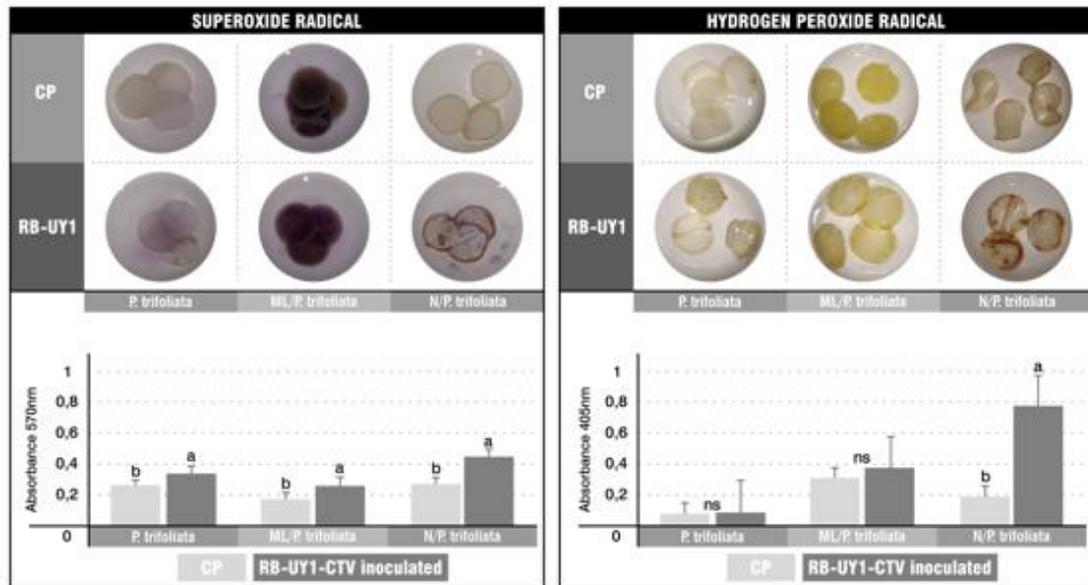


Fig. 6. Evaluation of oxidative stress quantifying superoxide and hydrogen peroxide radicals by histological staining method in discs leaf of *P. trifoliata*, ML/*P. trifoliata* and N/*P. trifoliata*, in non-inoculated control plants (CP) and inoculated (RB-UY1-CTV) plants, 36 months post-infection with RB-UY1-CTV isolate. On the top, picture with leaf discs stained with MTT for superoxide determination (left) and with DAB (right) for hydrogen peroxide determination in each treatment. Absorbance data, at 570nm and 405nm respectively, are the means of three replicates \pm standard error. Different letters (a, b) denote significant differences at $P \leq 0.05$; ns: not significant differences.

5.5.6. Total phenol content and ROS scavenging enzymes.

The total phenolic content was significantly higher in RB-inoculated *P. trifoliata* and N/*P. trifoliata* plants (Table 1). In contrast, no statistically significant differences were found in enzymatic activity for APX and CAT among control and RB-inoculated plants (Table 1).

Table 1. Plant antioxidant response to infection by the RB-UY1-CTV isolate evaluated through the total phenolic content and ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) activities in leaf tissue of *P. trifoliata*, ML/*P. trifoliata* and N/*P. trifoliata*, non-inoculated control plants and inoculated (RB-UY1_CTV) plants at the end of the experiment (36 months post-infection).

Treatment	Total phenol content mg Gallic acid/100g leaf tissue	Enzyme activity ($\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$)	
		APX	CAT
<i>P. trifoliata</i>	559 b \pm 17	0.07 a \pm 0.008	13.8 a \pm 1.5
<i>P. trifoliata</i> +RB-UY1	962 a \pm 22	0.11 a \pm 0.02	23.4 a \pm 2.7
ML/ <i>P. trifoliata</i>	1273 a \pm 4	0.11 a \pm 0.008	16.8 a \pm 2.2
ML/ <i>P. trifoliata</i> +RB-UY1	1331 a \pm 7	0.08 a \pm 0.01	19.3 a \pm 1.7
N/ <i>P. trifoliata</i>	1525 b \pm 17	0.03 a \pm 0.003	21.2 a \pm 1.2
N/ <i>P. trifoliata</i> +RB-UY1	2117 a \pm 25	0.05 a \pm 0.006	11.8 a \pm 1.3

The data are the means values of three replicates \pm standard error. Different letters (a, b) denote significant differences at $P \leq 0.05$.

5.6. Discussion

P. trifoliata was considered the only genotype resistant to most CTV strains until the RB strain was identified. Consequently, this rootstock is widely used in citrus-growing regions where the virus is endemic. The RB-UY1 isolate was the first RB isolate reported in Uruguay (Hernández-Rodríguez et al., 2017) and it was biologically characterized on indicator plants as a mild isolate (Rubio et al., 2023). However, CTV isolates are known to exhibit different biological responses depending on the host species, scion–rootstock combinations, infection timing and environmental conditions (Moreno et al., 2008; Dawson et al., 2013). Therefore, the RB-UY1 isolate could affect the performance of *P. trifoliata*.

As expected, bioassays revealed that RB-inoculated *P. trifoliata* and N/*P. trifoliata* plants did not exhibit foliar symptoms associated with CTV infection. The virus generally does not induce foliar symptoms in N/*P. trifoliata* plants, and most RB isolates characterized worldwide cause asymptomatic infections in *P. trifoliata* (Harper et al., 2010; Roy et al., 2013). Instead, mild symptoms were observed in ML, the most CTV susceptible specie, confirming the RB-UY1-CTV as a mild isolate. However, mild to moderate stem pitting was observed in *P. trifoliata* four years after

inoculation, this symptom is commonly associated with reduced growth and yield of affected plants (Dawson et al., 2013). The stem pitting observed exclusively in the rootstock can be attributed to the specific interaction between RB strains and trifoliolate rootstocks (Tatineni et al., 2008; Dawson et al., 2013), as its manifestation and severity depends on the differential expression of p33, p18, and p13 CTV genes in the host species (Tatineni et al., 2008; Tatineni and Dawson, 2012). Nevertheless, reports from China and Southern Africa indicate that RB strains have also induced stem pitting in sweet orange, grapefruit, and lime plants (Wang et al., 2019; Cook et al., 2016).

Despite the absence of visible symptoms, all viral infections represent a stress for the plant and affect its normal metabolism. Some studies have indicated that the photosynthetic capacity of ML plants may be reduced by CTV infection (Pérez-Clemente et al., 2015). However, other studies have demonstrated that long-term infection does not induce significant changes in this process (Hančević et al., 2018). Our results indicate that the photosynthetic activity of *P. trifoliata* and the grafted species was not affected by infection with the RB-UY1-CTV isolate. The photochemical efficiency, expressed as F_v/F_m , remained approximately 0.8 across all treatments, indicating that the plants were able to grow under optimal physiological conditions (Björkman and Demming-Adams, 1987). Conversely, previous studies have reported a decrease in F_v/F_m and Φ_{PSII} in ML infected with CTV, attributing this effect to alterations in the electron transport and a possible photoinhibition process (Pérez-Clemente et al., 2015). The RB-UY1-CTV isolate only affected the chlorophyll index, inducing a significant reduction in ML/*P. trifoliata* and N/*P. trifoliata* plants four years post-inoculation. This could have reduced the efficiency of the light-harvesting complexes (Lee et al., 2021). However, the absence of changes in F_o values suggest that the antenna complex was not damaged and that energy capture was not compromised. Therefore, the RB-UY1-CTV isolate had no significant impact on chlorophyll fluorescence parameters.

Furthermore, viral infection can also affect the mechanism involved in CO₂ assimilation, such as stomatal opening and diffusion through the mesophyll (Sampol et al., 2003). In our experiment, RB-inoculated plants exhibited higher stomatal conductance and CO₂ availability within the sub-stomatal cells (C_i), during the early

stages of infection. Therefore, there would be no discernible limitations in CO₂ assimilation between inoculated and control plants. According to Pérez-Clemente et al. (2019) the increased stomatal conductance observed in CTV-infected plants is a consequence of the lower abscisic acid (ABA) levels; in order to prioritize defense signaling pathways increasing the production of salicylic and jasmonic acid. However, when *A* was negatively affected by the RB-UY1-CTV isolate in N/*P. trifoliata* plants at the beginning of the experiment and in ML/*P. trifoliata* plants at the end of it, a reduction in *g_s* was observed. This indicates that limitations in CO₂ availability and/or diffusion contributed to a decreased rate of CO₂ fixation. In these instances, lower *C_i/C_a* values were recorded, evidencing the presence of stomatal limitations. Pérez Clemente et al. (2015), on the other hand, observed a reduction in *A* and *g_s* values in CTV-inoculated ML, however this was accompanied by an increase in the *C_i/C_a* ratio, which was attributed to a decline in carboxylative efficiency. Conversely, Hančević et al. (2018) did not detect alterations in leaf gas exchange parameters or chlorophyll content in CTV-inoculated ML over an extended period (10 years). These authors assume that in long-term infections regulatory mechanisms may exist between the host and the virus, allowing both to coexist, which is consistent with our results since some parameters were altered only in early stages of infection. Recent studies suggest a potential trade-off between photosynthetic activity and defense against pathogens, mediated by stomatal anatomy (Muir, 2020) and the hormonal regulation.

Regarding oxidative damage, as indicated by MDA levels, no evidence of oxidative burst was observed in any of the treatments. Although higher levels of H₂O₂ and O₂- radicals were detected in RB-inoculated plants, these did not result in cellular damage. However, these values may have been overestimated due to oxidative stress induced by leaf discs cutting during staining procedure. It is also likely, that antioxidant mechanisms were activated, contributing to the prevention of oxidative damage. Indeed, RB-inoculated N/*P. trifoliata* and the rootstock exhibited a significantly increased concentration of phenolic compounds, consistent with the findings of Munir et al. (2018), who reported that elevated phenolic content may serve as an antioxidant response to CTV in sweet oranges. These compounds can restrict viral movement, generate defense signals, and can neutralize oxidative stress, among

other functions (Kaur et al., 2022). In contrast, no increase in phenolic content was observed in RB-inoculated ML/*P. trifoliata* plants. This response is characteristic of susceptible hosts, which often exhibit lower production of secondary metabolites (Siddique et al., 2014). With respect to antioxidant enzyme activity, no significant differences in APX or CAT levels were observed across treatments. However, the involvement of other antioxidant enzymes cannot be excluded. Previous studies have reported changes in superoxide dismutase (SOD), polyphenol oxidase (PPO) and glutathione S-transferase, as well as the expression of genes related to them in response to CTV infection (Dória et al., 2015; Hančević et al., 2018).

The growth parameters, specifically plant height and leaf area were significantly affected in RB-inoculated *P. trifoliata* and ML/*P. trifoliata* plants four years post-inoculation. However, no such effects were observed in N/*P. trifoliata* plants. Since photosynthetic parameters remained unchanged and there was no evidence of oxidative damage, we inferred that growth limitations were not due to reduced carbohydrate synthesis. Instead, these constraints are more likely attributable to disruptions in carbohydrate transport, alterations in their metabolism, or even hormonal imbalances (Hull, 2014; Zaho et al., 2021; Padmanabhan et al., 2023). A critical factor contributing to this limitation could be stem pitting formation, as it induces changes in cell differentiation and development, leading to abnormal phloem formation (Tatineni and Dawson, 2012), which interfere with the normal transport of carbohydrates. Moreover, recent studies have confirmed that during stem pitting formation, CTV also invades xylem cells (Folimonova and Sun, 2022). Consequently, stem pitting can disrupt the transport of nutrients and water, affecting plant growth.

These findings reinforce the hypothesis that growth limitations in plants infected with RB-UY1-CTV are primarily associated with disruptions in resource transport due to structural modifications in the phloem and xylem, rather than a deficiency in carbohydrate production. Additionally, the virus can alter carbohydrate metabolism by inducing starch accumulation and redirecting synthesized carbohydrates towards the production of soluble sugars for viral replication, or to the synthesis of defense compounds such as phenols and flavonoids, rather than allocating resource to plant growth. In contrast, N/*P. trifoliata* plants exhibited no symptoms or physiological

alterations in the scion, consistent with field trials on grapefruit trees developed in South Africa, where RB isolates did not negatively impact plant performance despite achieving high viral loads (Cook et al., 2016). Therefore, the results suggest a clear interaction between genotype-host and viral isolate (RB-UY1-CTV), likely mediated by differential gene expression in either the host or virus, or by variations in the virus's ability to move and colonize host tissues (Dawson et al., 2013; Harper et al., 2014). Further studies of the host response to infection are required to elucidate the metabolic and genetic pathways involved in the interaction between *P. trifoliata* and RB-CTV isolates.

5.7. References

- Albiach-Marti, M., Grosser, J., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S. & Dawson, W. (2004). *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding*, 14, 117–128. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000038000.51218.a7>.
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P. & Gómez-Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant Cell Physiology*, 44(4), 388 -94. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg059>.
- Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., et al. (2008). Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *European Journal Plant Pathology*, 120, 177–188. <https://doi.org/10.1007/s10658-007-9206-9>.
- Björkman, O. & Demming-Adams, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170 (4), 480-504. <https://doi.org/10.1007/BF00402983>.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Cook, G., van Vuuren, S.P., Breytenbach, H.J., Steyn, C., Burger, J.T. & Maree, H.J. (2016). Characterization of *Citrus tristeza virus* single-variant sources in grapefruit in greenhouse and field trials. *Plant Disease*, 100(11), 2251-2256. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0391-RE>.
- Dawson, W., Garnsey, S., Tatineni, S., Folimonova, S., Harper, S. & Gowda, S. (2013). Citrus tristeza virus-host interaction. *Frontiers in Microbiology*, 4, 88. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00088>.
- Dawson, W., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. & Moreno, P. (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review Phytopathology*, 53(1), 137-55. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>.
- Dhindsa, S. & Matowe, W. (1981). Drought tolerance in two mosses: correlated with enzymatic defence against lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany*, 32, 79-91. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/32.1.79>.
- Dória, M.S., Sousa, A., Barbosa, C.D., et al. (2015). *Citrus tristeza virus* (CTV) causing proteomic and enzymatic changes in sweet orange variety 'Westin'. *PLoS ONE*, 10, e0130950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130950>.
- Folimonova, S., Achor, D. & Bar-Joseph, M. (2020). Walking Together: Cross-Protection, Genome Conservation, and the Replication Machinery of *Citrus tristeza virus*. *Viruses*, 12(12), 1353. <https://doi.org/10.3390/v12121353>.
- Folimonova, S. & Sun, Y. (2022). Citrus Tristeza Virus: From Pathogen to Panacea. *Annual Review Virology*, 29 (1), 417-435. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100520-114412>.
- Garnsey, S., Gumpf, D., Roistacher, C., Civerolo, E., Lee, R., Yokomi, R. & Bar-Joseph, M. (1987). Toward standardized evaluation of the biological properties of *Citrus tristeza virus*. *Phytophylactica*, 19, 151-157. https://hdl.handle.net/10520/AJA03701263_997.
- Hančević, K., Tomislav, R., Paskovic, I. & Urlić, B. (2018). Biochemical and physiological responses to long-term *Citrus tristeza virus* infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology*, 67(4), 987-994. <https://doi.org/10.1111/ppa.12799>.

- Harper, S., Dawson, T., & Pearson, M. (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archive of Virology*, 155 (4), 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0604-5>.
- Harper, S., Cowell, S., Robertson, C. & Dawson, W. (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 460, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.035>.
- Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Arruabarrena, A., Rubio, L., Rivas, F., Benítez-Galeano, M.J., Colina, R. & Maeso, D. (2017). First report of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in 'Newhall' sweet Orange in South America. *Plant Disease*, 101, 1063. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0430-PDN>.
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* 5th Edition. Academic Press. ISBN 978-0-12-384871-0. pp: 1104.
- Jiang, T. & Zhou, T. (2023). Unraveling the mechanisms of virus-induced symptom development in plants. *Plants*, 12(15), 2830. <https://doi.org/10.3390/plants12152830>.
- Karasev, A., Boyko, V., Gowda, S., Nikolaeva, O., Hilf, M., Koonin, E., Niblett, C., Cline, K., Gumpf, D., Lee, R., et al. (1995). Complete sequence of the *Citrus tristeza virus* RNA genome. *Virology*, 208(2), 511-20. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>.
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., & Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens- Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 485-504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>
- Kramer, D., Johnson, G., Kiirats, O., et al. (2004). New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research*, 79, 209–218. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000015391.99477.0d>.
- Moreno, P, Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. & Pena, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-68. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455>.

- Muir, C. (2020). A stomatal model of anatomical tradeoffs between gas exchange and pathogen colonization. *Frontiers Plant Science*, 11, 518991. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.518991>.
- Munir, N., Hameed, A. A., Haq, R., & Naz, S. (2019). Mudanças bioquímicas em vários cultivares de laranjas doces infectadas com o vírus citrus tristeza. *Brazilian Journal of Biology*, 79, 742-748. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.193791>.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and cell physiology*, 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Padmanabhan, M.S., Goregaoker, S.P., Golem, S., Shiferaw, H. & Culver, J.N. (2005). Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *Journal of Virology*, 79(4), 2549–2558. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2549-2558.2005>.
- Pérez-Clemente, R., Montoliu, A., Vives, V., López-Climent, M., & Gómez-Cadenas, A. (2015). Photosynthetic and antioxidant responses of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) plants to Citrus tristeza virus infection. *Plant Pathology*, 64, 16-24. <https://doi.org/10.1111/ppa.12241>.
- Pérez-Clemente, R. M., Montoliu, A., Vives-Peris, V., Arbona, V., & Gómez-Cadenas, A. (2019). Hormonal and metabolic responses of Mexican lime plants to CTV infection. *Journal of Plant Physiology*, 238, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.001>.
- Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., et al. (2009). Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*, 9, 1-18. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-9-28>.
- Rao, M. V., Paliyath, G., & Ormrod, D. P. (1996). Ultraviolet-B-and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant physiology*, 110(1), 125-136. <https://doi.org/10.1104/pp.110.1.125>
- Rivas, F., Fornes, F., Rodrigo, M., Zacarías, L. & Agustí, M. (2008). Girdling induces oxidative damage and triggers enzymatic and non-enzymatic antioxidative

- defences in citrus leaves. *Environmental and Experimental Botany*, 64(3), 256-263. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.07.006>.
- Rivas, F., Fornes, F., Rodrigo, M., Zacarías, L. & Agustí, M. (2011). Changes in carotenoids and ABA content in citrus leaves in response to girdling. *Scientia Horticulturae*, 127, 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.11.010>.
- Roistacher, C. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus, handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome, pp 17–25.
- Roy, A., Choudhary, N., Hartung, J. & Brlansky, R. (2013). The prevalence of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Disease*, 97, 1227-1234. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0012-RE>.
- Rubio, L., Arruabarrena, A., Salvo, M., Castells, et al. (2023). Biological and molecular characterization of a resistance-breaking isolate of *Citrus tristeza virus* from Uruguay and its effects on *Poncirus trifoliata* growth performance. *Archive of Virology*, 168(4), 123. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05749-y>.
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H., & Flexas, J. (2003). Analysis of the virus-induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist*, 160(2):403-412. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00882>.
- Sánchez-Rangel, J. C., Benavides, J., Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., & Jacobo-Velázquez, D. A. (2013). The Folin–Ciocalteu assay revisited: improvement of its specificity for total phenolic content determination. *Analytical methods*, 5(21), 5990-5999. <https://doi.org/10.1039/C3AY41125G>.
- Scott, K., Hlela, Q., Zablocki, O., Read, D., van Vuuren, S. & Pietersen, G. (2013). Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting *Citrus tristeza virus* strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Archives of Virology*, 158(1), 27-37. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1450-4>.
- Siddique, Z., Akhtar, K. P., Hameed, A., Sarwar, N., Imran-Ul-Haq, & Khan, S. A. (2014). Biochemical alterations in leaves of resistant and susceptible cotton genotypes infected systemically by cotton leaf curl *Burewala virus*. *Journal of*

Plant Interactions, 9(1), 702-711.
<https://doi.org/10.1080/17429145.2014.905800>

- Tatineni, S., Sagaram, U. S., Gowda, S., Robertson, C. J., Dawson, W. O., Iwanami, T., & Wang, N. (2008). In planta distribution of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR. *Phytopathology*, 98(5), 592-599. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-5-0592>
- Tatineni, S. & Dawson, W.O. (2012). Enhancement or attenuation of disease by deletion of genes from *Citrus tristeza virus*. *Journal of Virology*, 86(15), 7850-7857 <https://doi.org/10.1128/jvi.00916-12>.
- van Kooten, O., & Snell, J. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25, 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00033156>
- van Loon, L., Rep, M. & Pieterse, C. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1), 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.
- Wang, J., Zhou, T., Cao, M., Zhou, Y. & Li, Z. (2019). First report of *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in *Citrus grandis* in China. *Journal of Plant Pathology*, 101(2), 451. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0169-9>.
- Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Chiumenti, M. & Hajeri, S. (2017). Identification and characterization of *Citrus tristeza virus* isolates breaking resistance in trifoliolate orange in California. *Phytopathology*, 107, 901–908. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0007-R>.
- Zhao, S., & Li, Y. (2021). Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. *PLoS Pathogens*, 17(2), e1009242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009242>.

6. Discusión general

P. trifoliata constituye el principal portainjerto de la citricultura nacional y una de las principales estrategias de manejo contra CTV. Sin embargo, la circulación de variantes del genotipo RB del virus ha generado preocupación debido a la escasa información sobre sus posibles efectos fisiológicos y productivos en el portainjerto.

En primera instancia, este trabajo abordó el estudio de las características genéticas y biológicas del primer aislado RB de CTV (RB-UY1) reportado en Uruguay. La secuenciación del genoma completo del aislado RB-UY1 permitió identificarlo como un aislado recombinante del grupo RB1, con regiones genéticas correspondientes al genotipo T3 y una alta homología con los aislados RB previamente caracterizados en Nueva Zelanda. Los eventos de recombinación son frecuentes en CTV y dentro del genotipo RB (Cook, 2019; Yokomi et al., 2017), donde parecen constituir un mecanismo evolutivo recurrente (Rubio et al., 2001). La recombinación permite generar nuevas variantes virales, con ventajas adaptativas como una mayor capacidad de evadir las defensas del hospedero, una replicación más eficiente, o un aumento en la movilidad, entre otros. Por lo tanto, el carácter de recombinante del aislado RB-UY1 adquiere relevancia en el contexto de Uruguay, donde el virus es endémico, circula un vector muy eficiente, prevalecen aislados severos y hay gran diversidad genética de CTV (Benítez-Galeano et al., 2018; Rubio et al., 2018), condiciones para que este genoma pueda evolucionar a variantes más virulentas y con mayores consecuencias productivas.

La severidad del aislado RB-UY1 fue evaluada mediante indexaje biológico en plantas indicadoras, lo que permitió clasificarlo como un aislado suave de CTV. Estos resultados concuerdan con estudios previos de aislados RB procedentes de Puerto Rico y California (Roy et al., 2013; Yokomi et al., 2017). No obstante, hay reportes de aislados RB que inducen acanaladuras de madera en ML, pomelo Duncan y naranjo dulce (Wang et al., 2019). El ensayo de respuesta fisiológica confirmó los resultados del indexaje biológico, ya que solo se observaron síntomas foliares leves en ML/*P. trifoliata*. Sin embargo, cuatro años después de la inoculación, la evaluación de síntomas en los tallos de las plantas inoculadas reveló la presencia de acanaladuras de

la madera en el portainjerto, de intensidad leve a moderadas, síntoma asociado a la pérdida de vigor y rendimiento (Dawson et al., 2013; Folimonova y Sun, 2022). No obstante, en Sudáfrica, han observado moderadas acanaladuras de madera en árboles de pomelo/*P. trifoliata* cultivados en campo, sin importantes implicancias productivas (Cook et al., 2021).

Los ensayos de transmisión demostraron que *T. citricida* ha sido eficiente en transferir el aislado RB-UY1 entre plantas; este pulgón podría, entonces, dispersar fácilmente esta variante en la región. Además, *T. citricida* ha sido capaz de filtrar el aislado RB desde una planta con otras variantes genéticas de CTV, por lo que podría perfectamente originar nuevas variantes RB en condiciones de campo.

En relación con la respuesta fisiológica de las plantas frente a la infección por el aislado RB-UY1, no se observaron alteraciones significativas en la actividad fotosintética de las especies evaluadas. Durante las etapas iniciales de la infección, las plantas inoculadas con el aislado RB-UY1 mostraron mayor conductancia estomática, comportamiento que estaría asociado a menores niveles de ABA para priorizar señales de defensas frente al cierre estomático (Pérez-Clemente et al., 2019). No obstante, cuando se registraron disminuciones en la tasa de fotosíntesis neta, hubo limitaciones estomáticas reflejadas en una reducción de g_s y la relación C_i/C_a . Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Hančević et al. (2018), quienes tampoco detectaron alteraciones significativas en el proceso de fotosíntesis en plantas de ML infectadas con CTV durante un período prolongado. Investigaciones recientes proponen que podría existir un equilibrio dinámico entre la actividad fotosintética y las respuestas de defensa frente a patógenos mediadas por características anatómicas estomáticas y una compleja regulación hormonal (Muir, 2020).

Por otro lado, no se detectó daño oxidativo en el tejido foliar de las plantas inoculadas, aunque estas registraron mayores niveles de especies reactivas de oxígeno (H_2O_2 y O_2^-). Sin embargo, este incremento en ROS podría, en parte, atribuirse al estrés oxidativo inducido por el procedimiento de corte de tejidos. Como respuesta antioxidante, *N/P. trifoliata* y el portainjerto inoculados con el aislado RB-UY1 mostraron una concentración significativamente mayor de compuestos fenólicos, en concordancia con lo reportado por Munir et al. (2019). Estos compuestos pueden

promover procesos como la lignificación, reforzando las barreras estructurales del tejido y dificultando la diseminación del virus dentro del floema, además generan señales de defensa y pueden neutralizar el estrés oxidativo, entre otras funciones (Kaur et al., 2022). En cuanto a la actividad enzimática antioxidante, no se observaron diferencias significativas en los niveles de APX o CAT entre los tratamientos. Sin embargo, otras enzimas antioxidantes pueden estar involucradas en la respuesta frente al estrés. Estudios previos han reportado cambios en la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), la polifenol oxidasa (PPO) y la glutatión S-transferasa, así como la expresión de genes relacionados a estas enzimas, en respuesta a la infección por CTV (Dória et al., 2015; Hančević et al., 2018).

Los parámetros de crecimiento, específicamente la altura de la planta y el área foliar, se vieron significativamente afectados en las plantas de *P. trifoliata* y ML/*P. trifoliata* inoculadas con RB-UY1 cuatro años después de la inoculación. Sin embargo, no se observaron tales efectos en las plantas de N/*P. trifoliata*. Estas limitaciones de crecimiento probablemente se expliquen por una alteración en el metabolismo y transporte de carbohidratos a causa de la presencia de acanaladuras de la madera o de un desbalance hormonal, tal como ha sido reportado en otros estudios (Hull, 2014; Folimonova y Sun, 2022; Padmanabhan et al., 20; Zaho y Li, 2021).

En conclusión, en etapas iniciales de la infección, la variante RB-UY1 mostró el comportamiento característico de un aislado suave de CTV, sin provocar alteraciones evidentes en el portainjerto ni en las variedades cítricas evaluadas. Esta aparente baja patogenicidad podría explicarse por una lenta replicación inicial o limitada capacidad de colonizar los tejidos en el portainjerto. No obstante, a medida que avanzó el tiempo de infección, esta variante afectó gradualmente la especie susceptible (lima Mexicana) y el portainjerto, lo que resultó en un retraso de crecimiento en ambas. En contraste, la variedad navel no afectó su desempeño fisiológico, en concordancia con observaciones de campo en árboles de pomelo en Sudáfrica, donde aislados RB no comprometieron su rendimiento, a pesar de alcanzar altas cargas virales (Cook et al., 2021). Estos resultados refuerzan la hipótesis de una interacción altamente específica entre huésped y aislado, determinada posiblemente por mecanismos de expresión génica diferencial tanto en el huésped como en el virus, o por variaciones en la

capacidad del virus para moverse y colonizar los tejidos del huésped (Dawson et al., 2013; Harper et al., 2014). Futuros trabajos focalizados en continuar profundizando en el conocimiento de los mecanismos subyacentes a esta interacción y dilucidar las vías metabólicas y genéticas involucradas, serán de gran ayuda para orientar el desarrollo de estrategias más eficaces para el manejo de aislados de RB-CTV.

7. Conclusiones

El aislado RB-UY1 fue identificado como un aislado RB recombinante con el genotipo T3, estrechamente relacionado con los aislados de Nueva Zelanda. Aunque inicialmente se comportó como un aislado suave, con el tiempo tuvo la capacidad de inducir acanaladuras de la madera de intensidad leves a moderadas. Así como también, fue eficientemente transmitido por *T. citricida*, incluso en presencia de otras variantes del virus.

En términos fisiológicos, RB-UY1 no afectó la actividad fotosintética ni generó daño oxidativo, aunque se registraron aumentos en H_2O_2 y O_2^- . Sin embargo, la infección provocó una reducción del crecimiento en *P. trifoliata* y ML/*P. trifoliata*, mientras que Navel/*P. trifoliata* permaneció sin alteraciones. El incremento del contenido de fenoles, junto con la ausencia de cambios en APX y CAT, sugiere una respuesta moderada del sistema antioxidante frente al aislado.

En síntesis, los resultados indican que RB-UY1 exhibe una virulencia de evolución gradual y una respuesta claramente condicionada por el genotipo hospedero, siendo *P. trifoliata* la especie que manifestó un retraso significativo del crecimiento a medida que avanzó la infección.

8. Bibliografía

- Albiach-Martí, M. R., Mawassi, M., Gowda, S., Satyanarayana, T., Hilf, M. E., Shanker, S., Almira, E. C., Vives, M. C., López, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S. M. y Dawson, W. O. (2000). Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology*, 74(15), 6856-6865. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6856-6865.2000>
- Albiach-Martí, M., Grosser, J., Gowda, S., Mawassi, M., Satyanarayana, T., Garnsey, S. y Dawson, W. (2004). *Citrus tristeza virus* replicates and forms infectious virions in protoplasts of resistant citrus relatives. *Molecular Breeding*, 14, 117-128. <https://doi.org/10.1023/B:MOLB.0000038000.51218.a7>
- Albiach-Martí, M. (2012). Molecular virology and pathogenicity of *Citrus tristeza virus*. En M. Garcia y V. Romanowski (eds.), *Viral genomes - molecular structure, diversity, gene expression mechanisms and host-virus interactions* (pp. 275-310). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/27052>
- Agranovsky, A. (1996). Principles of molecular organization, expression, and evolution of *Closteroviruses*: over the barriers. *Advances in Virus Research*, 47, 119-158. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(08\)60735-6](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60735-6)
- Agustí, M. (2003). *Citricultura*. Mundi-Prensa.
- Agustí, M., Mesejo, C., Reig, C. y Martínez-Fuentes, A. (2014). Citrus production. En G. R. Dixon y D. E. Aldous, *Horticulture: plants for people and places, volume 1: production horticulture* (pp. 159-195). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-8578-56>
- Aknadibossian, V., Huguet-Tapia, J. C., Golyaev, V., Pooggin, M. M. y Folimonova, S. Y. (2023). Transcriptomic alterations in the sweet orange vasculature correlate with growth repression induced by a variant of *Citrus tristeza virus*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1162613. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1162613>
- Arbona, V., Flors, V., Jacas, J., García-Agustín, P. y Gómez-Cadenas, A. (2003). Enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses of Carrizo citrange, a salt-

- sensitive citrus rootstock, to different levels of salinity. *Plant & Cell Physiology*, 44(4), 388-394. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg059>
- Arbona, V., Hossain, Z., López-Climent, M., Pérez-Clemente, R. y Gómez-Cadenas, A. (2008). Antioxidant enzymatic activity is linked to waterlogging stress tolerance in citrus. *Physiologia Plantarum*, 132(4), 452-466. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2007.01029.x>
- Arbona, V., López-Climent, M. F., Pérez-Clemente, R. M. y Gómez-Cadenas, A. (2009). Maintenance of a high photosynthetic performance is linked to flooding tolerance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 66(1), 135-42. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.12.011>
- Ayllón, M. A., Rubio, L., Moya, A., Guerri, J. y Moreno, P. (1999). The haplotype distribution of two genes of *Citrus tristeza virus* is altered after host change or aphid transmission. *Virology*, 255(1), 32-39. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9566>
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2008). Fundamentos de Fisiología Vegetal. En *Fisiología de las plantas y el estrés* (pp. 577-597). Interamericana-McGraw-Hill.
- Balachandran, S., Hull, R. J., Martins, R. A., Vaadia, Y. y Lucas, W. J. (1997). Influence of environmental stress on biomass partitioning in transgenic tobacco plants expressing the movement protein of *Tobacco mosaic virus*. *Plant Physiology*, 114(2), 475-481. <https://doi.org/10.1104/pp.114.2.475>
- Bar-Joseph, M. y Lee, R. (1989). The continuous challenge of citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 291-316. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001451>
- Benítez-Galeano, M., Vallet, T., Carrau, L., Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Rivas, F., Rubio, L., Maeso, D., Vignuzzi, M., Moratorio, G. y Colina, R. (2018). Complete genome sequence of a novel recombinant *Citrus tristeza virus*: a resistance-breaking isolate from Uruguay. *Genome Announcements*, 6(22), e00442-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.6856-6865.2000>
- Benítez-Galeano, M. J., Hernández-Rodríguez, L., Dalmao, F., Bertoni, E., Bertalmío, A., Rubio, L., Rivas, F., Maeso, D. y Colina, R. (2021). First comprehensive

- sanitary report of citrus-infecting viruses and viroids in Uruguay. *Journal of Citrus Pathology*, 8(1). <http://dx.doi.org/10.5070/C481049181>
- Bentancour, C., Scatoni, I. y Morelli, E. (2009). *Insectos del Uruguay*. Universidad de la República.
- Bertalmío, A., Maeso, D., Sanguinetti, G., Fontán, G., De los Santos, M., Borde, J., Montes, F., Colina, R. y Rivas, F. (2012). Saneamiento y certificación de cítricos. *Revista INIA*, 31, 49-53. <https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2199/1/12940040213111852.pdf>
- Broadbent, P., Brlansky, R. y Indsto, J. (1996). Biological characterization of Australian isolates of *Citrus tristeza virus* and separation of subisolates by single aphid transmissions. *Plant Disease*, 80, 329-333. <https://doi.org/10.1094/PD-80-0329>
- Calil, I. P. y Fontes, E. P. (2017). Plant immunity against viruses: antiviral immune receptors in focus. *Annals of Botany*, 119(5), 711-723. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw200>
- Carr, J. P., Murphy, A. M., Tungadi, T. y Yoon, J. Y. (2019). Plant defense signals: players and pawns in plant-virus-vector interactions. *Plant Science*, 279, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.04.011>
- Citrus World Statistics. (2022). <https://worldcitrusorganisation.org/activities/citrus-world-statistics/>
- Cook, G. (2019). *Characterization of Citrus tristeza virus variants and their influence on symptom expression in grapefruit* [tesis de doctorado, Stellenbosch University]. Dspace. <https://scholar.sun.ac.za/handle/10019.1/105724>
- Cook G., Breytenbach J., Steyn C., de Bruyn R., van Vuuren S., Burger J. y Maree H. (2021). Grapefruit field trial evaluation of *Citrus tristeza virus* T68-Strain Sources. *Plant Disease*, 105, 361-367. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1259-RE>
- Costa, A., Nunes, W., Corazza, M., Zanutto, C. y Müller, G. (2010). Biological and molecular characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* with potential for use in preimmunization programs. *Summa Phytopathologica*, 36, 81-82.

- Csorba, T., Kontra, L. y Burgyán, J. (2015). Viral silencing suppressors: tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479, 85-103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>
- Da Graça, J. V. y van Vuuren, S. P. (2010). Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*, 247-260.
- Davies, F. S. y Albrigo, L. G. (1994). *Citrus*. C. A. B. International Press Wallingford.
- Dawson, W. O. y Hilf, M. E. (1992). Host-range determinants of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 239–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.43.060192.002523>
- Dawson, T. E. y Mooney, P. A. (2000). Evidence for trifoliolate resistance breaking isolates of *Citrus tristeza virus* in New Zealand. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 14(14). <https://doi.org/10.5070/C59x93b3dr>
- Dawson, W. O., Garnsey, S. M., Tatineni, S., Folimonova, S. Y., Harper, S. J. y Gowda, S. (2013). *Citrus tristeza virus*-host interactions. *Frontiers in Microbiology*, 4, 88. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00088>
- Dawson, W. O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S. M. y Moreno, P. (2015). *Citrus tristeza virus*: making an ally from an enemy. *Annual Review of Phytopathology*, 53(1), 137-155. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>
- De Mendoza, A. H., Ballester-Olmos, J. F. y Pina, J. A. (1984). Transmission of *Citrus tristeza virus* by aphids (Homoptera, *Aphididae*) in Spain. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 9(9).
- Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). (2023). Anuario Estadístico Agropecuario 2023. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-agropecuario-2023>
- Dória, M. S., Sousa, A., Barbosa, C., Costa, M., Gesteira, A., Souza, R., Oliveira Freitas, A. C. y Pirovani, C. (2015). *Citrus tristeza virus* (CTV) causing proteomic and enzymatic changes in sweet orange variety “Westin”. *PLoS ONE*, 10(7), e0130950. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130950>

- Dos Santos Soares, A. M. y Machado, O. L. T. (2007). Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas*, 1(1), 10.
- Ferguson, L. y Grattan, S. R. (2005). How salinity damages citrus: osmotic effects and specific ion toxicities. *Tree Physiology*, 12, 195-216.
- Folimonova, S. Y., Achor, D. y Bar-Joseph, M. (2020). Walking together: cross-protection, genome conservation, and the replication machinery of *Citrus tristeza virus*. *Viruses*, 12(12), 1353. <https://doi.org/10.3390/v12121353>
- Folimonova, S. y Sun, Y. (2022). *Citrus tristeza virus*: from pathogen to panacea. *Annual Reviews*, 9, 417-435. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100520-114412>
- Gómez-Cadenas, A., Tadeo, F. R., Primo-Millo, E. y Talón, M. (1998). Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock. *Physiologia Plantarum*, 103(4), 475-484. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1030405.x>
- Gottwald, T. R., Garnsey, S. M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. y Borbon, J. (1996). Differential effects of *Toxoptera citricida* vs. *Aphis gossypii* on temporal increase and spatial patterns of spread of citrus tristeza. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 13(13). <https://doi.org/10.5070/C592v4x1wd>
- Hammond-Kosack, K. y Jones, J. (2000). Responses to Plant Pathogens. En B. B. Buchanan, W. Gruissem y R. L. Jones (eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (2.^a ed., pp. 984-1050). John Wiley & Sons.
- Hančević, K., Radić, T., Pasković, I. y Urlić, B. (2018). Biochemical and physiological responses to long-term *Citrus tristeza virus* infection in Mexican lime plants. *Plant Pathology*, 67(4), 987-994. <https://doi.org/10.1111/ppa.12799>
- Harper, S. J., Dawson, T. E. y Pearson, M. N. (2010). Isolates of *Citrus tristeza virus* that overcome *Poncirus trifoliata* resistance comprise a novel strain. *Archives of Virology*, 155, 471-480. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0604-5>

- Harper, S. (2013). *Citrus tristeza virus*: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, 4(93), 1-18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>
- Harper, S., Cowell, S., Robertson, J. y Dawson, W. (2014). Differential tropism in roots and shoots infected by *Citrus tristeza virus*. *Virology*, 460-461, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.035>
- Harper, S., Cowell, S. y Dawson, W. (2018). Bottlenecks and complementation in the aphid transmission of *Citrus tristeza virus* populations. *Archives of Virology*, 163, 3373-3376. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-4009-1>
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. En E. Lam, H. Fukuda y J. Greenberg, *Programmed cell death in higher plants* (pp. 77-90). https://doi.org/10.1007/978-94-010-0934-8_6
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H. P., Hajirezaei, M. y Sonnewald, U. (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1(1), 51-59. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2000.00007.x>
- Hernández-Rodríguez, L., Bertalmío, A., Arruabarrena, A., Rubio, L., Rivas, F., Benítez-Galeano, M. J., Colina, R. y Maeso, D. (2017). First report of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in ‘Newhall’ sweet Orange in South America. *Plant Disease*, 101, 1063. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0430-PDN>
- Hernández-Rodríguez, L., Benítez-Galeano, M. J., Bertalmío, A., Rubio, L., Rivas, F., Arruabarrena, A., Rolón, R., Colina, R. y Maeso, D. (2019). Diversity of Uruguayan *Citrus tristeza virus* populations segregated after single aphid transmission. *Tropical Plant Pathology*, 44, 352-362. <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00288-x>
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5.^a ed.). Elsevier.
- Iglesias, N. G., Gago-Zachert, S. P., Robledo, G., Costa, N., Plata, M. I., Vera, O., Grau, O. y Semorile, L. C. (2008). Population structure of *Citrus tristeza virus* from field Argentinean isolates. *Virus Genes*, 36, 199-207. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0169-x>

- Islam, W. (2017). Management of plant virus diseases; farmer's knowledge and our suggestions. *Hosts and Viruses*, 4(2), 28. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.bjv/2017/4.2.28.33>
- Islam, W., Naveed, H., Zaynab, M., Huang, Z. y Chen, H. Y. H. (2019). Plant defense against virus diseases; growth hormones in highlights. *Plant Signaling & Behavior*, 14(6). <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1596719>
- Karasev, A., Boyko, V., Gowda, S., Niko-laeva, O., Hilf, M., Koonin, E., Niblett, C., Cline, K., Gumpf, D., Lee, R., Garsney, S., Lewandowski. D. y Dawson W. (1995). Complete sequence of the Citrus tristeza virus RNA genome. *Virology*, 208, 511-520. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>
- Karasev, A. (2000). Genetic diversity and evolution of *Closteroviruses*. *Annual Review of Phytopathology*, 38, 293-324. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.38.1.293>
- Kaur, S., Samota, M. K., Choudhary, M., Choudhary, M., Pandey, A. K., Sharma, A., y Thakur, J. (2022). How do plants defend themselves against pathogens- Biochemical mechanisms and genetic interventions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 28(2), 485-504. <https://doi.org/10.1007/s12298-022-01146-y>
- Kawase, K. E. N. J. I., Iwagaki, I. S. A. O., Takahara, T. O. S. H. I. O., Ono, S. y Hirose, K. (1987). Rootstock studies for citrus varieties in Japan. *JARQ*, 20, 253-259. ircas.go.jp/sites/default/files/publication/jarq/20-4-253-259_0.pdf
- Korkmaz, S., Karanfil, A., Satar, S., Uslu, T., Koç, N. K. y Çevik, B. (2022). Effects of graft and aphid transmission on the genetic diversity and population structure of Turkish *Citrus tristeza virus* isolates. *European Journal of Plant Pathology*, 162(2), 369-388. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02409-2>
- Lamb, C. y Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 251-275. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.251>
- Lim, G. H., Shine, M. B., de Lorenzo, L., Yu, K., Cui, W., Navarre, D., Hunt, A., Lee, J., Kachroo, A. y Kachroo, P. (2016). Plasmodesmata localizing proteins regulate transport and signaling during systemic acquired immunity in

- plants. *Cell Host & Microbe*, 19(4), 541-549. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.006>
- Logan, B., Grace, S., Adams, W. y Demmig-Adams, B. (1998). Seasonal differences in xanthophyll cycle characteristics and antioxidants in *Mahonia repens* growing in different light environments. *Oecologia*, 116, 9-17. <https://doi.org/10.1007/PL00013823>
- López-Climent, M. F., Arbona, V., Pérez-Clemente, R. M. y Gómez-Cadenas, A. (2008). Relationship between salt tolerance and photosynthetic machinery performance in citrus. *Environmental and Experimental Botany*, 62(2), 176-184. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.08.002>
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F. y Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250(4983), 1002-1004. <https://doi.org/10.1126/science.250.4983.1002>
- Mandadi, K. y Scholtho, K. (2013). Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant Cell*, 25, 1489-1505. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.111658>
- Matos, L., Hilf, M., Cayetano, X., Feliz, A., Harper, S. y Folimonova, S. (2013). Dramatic change in *Citrus tristeza virus* populations in the Dominican Republic. *Plant Disease*, 97, 339-345. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-12-0421-RE>
- Melzer, M. J., Borth, W. B., Sether, D. M., Ferreira, S., Gonsalves, D. y Hu, J. S. (2010). Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian *Citrus tristeza virus*. *Virus Genes*, 40, 111-118. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0409-3>
- Mestre, P. F., Asins, M. J., Carbonell, E. A. y Navarro, L. (1997). New gene(s) involved in the resistance of *Poncirus trifoliata* to *Citrus tristeza virus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 691-695. <https://doi.org/10.1007/s001220050613>
- Morales Alfaro, J., Bermejo, A., Navarro, P., Quiñones, A. y Salvador, A. (2023). Effect of rootstock on citrus fruit quality: a review. *Food Reviews International*, 39(5), 2835-2853. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1978093>

- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Marti, M., Guerri, J. y Peña, L. (2008). *Citrus tristeza virus*: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, 9(2), 251-268. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>
- Muir, C. (2020). A stomatal model of anatomical tradeoffs between gas exchange and pathogen colonization. *Frontiers in Plant Science*, 11, 518991. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.518991>
- Müller, I. y Campiglia, H. (1981). Nivel de «stem pitting» (SP) en naranja ‘Valencia’ (*Citrus sinensis* (L) Obs.) y tangor ‘Ellendale’ (*C. reticulata blanco x C. sinensis* (L) Obs.) injertados en diferentes portainjertos. *Investigaciones Agronómicas*, 2 (1), 79-82
- Munir, N., Hameed, A. A., Haq, R. y Naz, S. (2019). Mudanças bioquímicas em vários cultivares de laranjas doces infectadas com o vírus citrus tristeza. *Brazilian Journal of Biology*, 79, 742-748. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.193791>
- Ollitrault, P. y Navarro, L. (2012) Citrus. En M. L. Badenes y D. H. Byrne (eds.), *Fruit Breeding* (pp. 623-662). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0763-9_16
- Padmanabhan, M. S., Goregaoker, S. P., Golem, S., Shiferaw, H. y Culver, J. N. (2005). Interaction of the *Tobacco mosaic virus* replicase protein with the Aux/IAA protein PAPI/IAA26 is associated with disease development. *Journal of Virology*, 79(4), 2549-2558. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.4.2549-2558.2005>
- Pérez Bueno, M. (2003). *Fotosistema II e infección viral: análisis de fluorescencia de imagen y regulación de la biosíntesis de las proteínas OEC durante la patogénesis* [tesis de doctorado]. Universidad de Granada.
- Pérez-Bueno, M. L., Rahoutei, J., Sajnani, C., García-Luque, I. y Barón, M. (2004). Proteomic analysis of the oxygen-evolving-complex of photosystem II under biotic stress. Studies on *Nicotiana benthamiana* infected with tobamoviruses. *Proteomic*, 4, 418-425. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300655>
- Pérez-Clemente, R., Montoliu, A., Vives, V., López-Climent, M. y Gómez-Cadenas, A. (2015). Photosynthetic and antioxidant responses of Mexican lime (*Citrus aurantifolia*) plants to citrus tristeza virus infection. *Plant Pathology*, 64(1), 16-24. <https://doi.org/10.1111/ppa.12241>

- Pérez-Clemente, R. M., Montoliu, A., Vives-Peris, V., Arbona, V. y Gómez-Cadenas, A. (2019). Hormonal and metabolic responses of Mexican lime plants to CTV infection. *Journal of Plant Physiology*, 238, 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.05.001>
- Poque, S., Wu, H. W., Huang, C. H., Cheng, H. W., Hu, W. C., Yang, J. Y. y Yeh, S. D. (2018). Potyviral gene-silencing suppressor HCPro interacts with salicylic acid (SA)-binding protein 3 to weaken SA-mediated defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(1), 86-100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-17-0128-FI>
- Rahoutei, J., García-Luque, I. y Barón, M. (2000). Inhibition of photosynthesis by viral infection: effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum*, 110(2), 286-292. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2000.110220.x>
- Rivas-Valencia, P., Domínguez-Monge, S., Santillán-Mendoza, R., Loeza-Kuk, E., Pérez-Hernández, O., Rodríguez-Quiblera, C. y Lomas-Barrié, C. (2020). Severe *Citrus tristeza virus* isolates from Eastern Mexico are related to the T36 genotype group. *American Journal of Plant Sciences*, 11, 1521-1532. <https://doi.org/10.4236/ajps.2020.1110110>
- Rocha-Peña, M., Lee, R., Lastra, R., Niblett, C., Ochoa-Corona, F., Garnsey, S. y Yokomi, R. (1995). *Citrus tristeza virus* and its aphid vector *Toxoptera citricida*: threats to citrus production in the Caribbean and central and North America. *Plant Disease*, 79, 437-443. <https://doi.org/10.1094/PD-79-0437>
- Roistacher, C. N., Da Graça, J. V. y Müller, G. W. (2010). Cross protection against *Citrus tristeza virus*-a review. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 17(17).
- Roistacher, C. N. (1991). *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*. Food & Agriculture Organization of the United Nations.
- Roy, A., Choudhary, N., Hartung, J. y Brlansky, R. (2013). The prevalence of the *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Disease*, 97, 1227-1234. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0012-RE>

- Rubio, L., Ayllón, M., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P. y Falk, B. (2001). Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *Journal of Virology*, 75, 8054-8062. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.17.8054-8062.2001>
- Rubio, L., Bertalmío, A., Hernández-Rodríguez, L., Benítez-Galeano, M.J, Arruabarrena, A., Rivas, F., Colina, R. y Maeso, D. (2018). Biological and molecular characterization of Uruguayan *Citrus tristeza virus* field isolates. *Journal of Plant Pathology*, 101, 97-105. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0149-0>
- Sampol, B., Bota, J., Riera, D., Medrano, H. y Flexas, J. (2003). Analysis of the virus induced inhibition of photosynthesis in malmsey grapevines. *New Phytologist*, 160(2), 403-412. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00882.x>
- Scott, K., Hlela, Q., Zablocki, O., Read, D., van Vuuren, S. y Pietersen, G. (2013). Genotype composition of populations of grapefruit-cross-protecting citrus tristeza virus strain GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Archives of Virology*, 158, 27-37. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1450-4>
- Sies, H. (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klinische Wochenschrift*, 69, 965-968. <https://doi.org/10.1007/BF01645140>
- Sies, H. (1993). Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213-219. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1993.tb18025.x>
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology: Translation and Integration*, 82(2), 291-295. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1997.sp004024>
- Van Vuuren, S. y Da Graça, J. (2000). Reduction in 'Marsh' grapefruit tree size infected with *Citrus tristeza virus* populations. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(5), 542-545. <https://doi.org/10.1080/14620316.2000.11511282>
- Wallace, J. M. (1978). Virus and viruslike diseases [of citrus]. *Citrus Industry Berkeley*. University of California, Division of Agricultural Sciences, 4, 67-184.

- Wang, J., Zhou, T., Cao, M., Zhou, Y. y Zhongan, L. (2019). First report of *Citrus tristeza virus* trifoliolate resistance-breaking (RB) genotype in *Citrus grandis* in China. *Journal Plant Pathology*, *101*, 453. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-0169-9>
- Weng, Z., Barthelson, R., Gowda, S., Hilf, M., Dawson. W., Galbraith, D. y Xiong, Z. (2007). Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS ONE*, *2*(9), e917. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000917>
- Yokomi, R., Lastra, R., Stoetzel, M., Damsteegt, V., Lee, R., Garnsey, S., Gottwald, T., Rocha-Pena, M. y Niblett, C. (1994). Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean Basin and transmission of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Economic Entomology*, *87*(4), 1078-1085. <https://doi.org/10.1093/jee/87.4.1078>
- Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Chiumenti, M. y Hajeri, S. (2017). Identification and characterization of *Citrus tristeza virus* isolates breaking resistance in trifoliolate orange in California. *Phytopathology*, *107*(7), 901-908. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0007-R>
- Yokomi, R., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Chiumenti, M., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Weng Z., Xiong Z. y Hajeri, S. (2018). Molecular and biological characterization of a novel mild strain of *Citrus tristeza virus* in California. *Archives of Virology*, *163*, 1795-1804. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3799-5>
- Zhao, S. y Li, Y. (2021). Current understanding of the interplays between host hormones and plant viral infections. *PLoS Pathogens*, *17*(2), e1009242. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009242>
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B. L. y Citovsky, V. (2011). Biology of callose (β -1, 3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma*, *248*, 117-130. <https://doi.org/10.1007/s00709-010-0247-0>