



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno *Citrus tristeza virus*  
(CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de  
Tumbaco – Ecuador**

Grijalva Mañay, Rosa Lucía

Vicerrectorado de Investigación, Innovación y Transferencia de Tecnología

Centro de Posgrados

Maestría de Investigación en Biotecnología Vegetal

Trabajo de titulación, previo a la obtención del título de Magister en Biotecnología Vegetal

Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D

16 de diciembre del 2021



Tesis Rosita Grijalva ESPE 2021.txt

Scanned on: 12:31 February 16, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	184
Words with Minor Changes	27
Paraphrased Words	264
Omitted Words	0



Website | Education | Businesses



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y  
TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA  
CENTRO DE POSGRADOS**

**CERTIFICACIÓN**

Certifico que el trabajo de titulación, “Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador”, fue realizado por la señora Grijalva Mañay, Rosa Lucía el mismo que ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 16 de diciembre de 2021

Firma:

Flores Flor, Francisco Javier, Ph.D

Director

C.C.: 1713443479



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA  
DE TECNOLOGÍA  
CENTRO DE POSGRADOS  
RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA**

Yo Grijalva Mañay, Rosa Lucía, con cédula de ciudadanía n° 1803891827, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: "Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador", es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 16 de diciembre de 2021

Firma:

Grijalva Mañay, Rosa Lucía

C.C.: 1803891827



**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN, INNOVACIÓN Y TRANSFERENCIA  
DE TECNOLOGÍA**

**CENTRO DE POSGRADOS**

**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN**

Yo Grijalva Mañay, Rosa Lucía, con cédula de ciudadanía n° 1803891827, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de titulación: "Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyer*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador" en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 16 de diciembre de 2021

Firma:

Grijalva Mañay, Rosa Lucía

C.C.: 1803891827

## DEDICATORIA

*A Dios, por haberme dado la vida y por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi formación profesional.*

*A mi esposo, Sebastián, mi compañero de aventuras, por su amor y paciencia, por apoyarme a conseguir mis sueños, por compartir mis alegrías y angustias y por estar junto a mí en todos mis logros.*

*A mis hermosos hijos, Sebas y Amelita, por ser mi inspiración, por comprenderme cuando les decía que mami tenía que estudiar, y por sus besos que me motivan siempre a seguir adelante.*

*El haber alcanzado esta meta fue gracias al apoyo de toda mi familia, por eso este trabajo se los dedico con mucho amor.*

## AGRADECIMIENTO

A Dios y a la Virgencita por ser mi fortaleza y llenar de bendiciones mi vida.

A la Universidad de las Fuerzas ESPE por otorgarme la beca de estudios que me permitió realizar este trabajo de investigación.

A la Dra. Valeria Ochoa, por siempre estar al pendiente de mis avances, por transmitirme valiosos conocimientos y por sus acertados consejos.

A la Dra. Karina Proaño por su motivación para realizar mis estudios de posgrado, por su confianza y paciencia desde mis primeros pasos en la investigación, mil gracias por permitirme ser parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Al Dr. Francisco Flores, mi director de tesis por su orientación durante la realización de esta investigación y su apertura para realizar los ensayos en el laboratorio IDgen. A Francisco Garrido por su gran ayuda con los análisis de laboratorio.

Al personal administrativo de becas y posgrados, Margarita, Sonia, Rosita, Katy, Silvi por brindarme su ayuda siempre en todas las gestiones administrativas, por su amistad y cariño.

A todos los docentes que compartieron sus conocimientos durante estos dos años de estudios de Maestría: Dra. Blanquita, Ing. Norman, Dra. Mónica, Dr. Antonio, Dra. Nardi, Dra. Daniela, M.Sc. Ma. José, a quienes expreso mi gratitud, admiración y aprecio. A Arianita por su apoyo como técnica del laboratorio, mil gracias.

Finalmente, quiero expresar un agradecimiento muy especial a mi familia, mi esposo Sebastián, mis bellos hijos Sebitas y Amelita, a mis papitos Jorge y Rosita, ñaños Belencita y Jorgito, mi Bulis, Cecilita y Vinicio por su preocupación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo de investigación, por sus bendiciones y ánimos para culminar con éxito esta hermosa etapa profesional.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria .....	6
Agradecimiento .....	7
Índice de Contenidos.....	9
Índice de Tablas .....	12
Índice de Figuras.....	13
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo 1: Introducción.....	16
Tema.....	16
Formulación del problema.....	16
Objetivos de la investigación.....	18
Objetivo general .....	18
Objetivos específicos .....	18
Marco Teórico.....	18
El cultivo de limón en Ecuador .....	18
Virus de la Tristeza de los Cítricos .....	20
Estructura y organización genómica del CTV .....	21
Evolución y variabilidad genética del CTV .....	23
Filogenia .....	25
Métodos de diagnóstico e identificación del CTV .....	26

Análisis y Anotación genómica.....	28
Hipótesis .....	30
Capítulo 2: Materiales y Métodos .....	31
Zona de estudio .....	31
Análisis de laboratorio.....	32
Período de duración de la investigación.....	32
Metodología .....	32
Diseño de primers .....	32
Obtención de muestras de hojas sintomáticas .....	32
Limpieza y desinfección del tejido vegetal.....	33
Extracción de ARN.....	33
Proceso de Transcripción inversa y Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR) .....	33
Anotación del genoma del CTV .....	35
Alineamiento múltiple de secuencias.....	36
Análisis filogenético para CTV.....	39
Capítulo 3: Resultados .....	40
Análisis molecular mediante amplificación por PCR.....	40
Análisis filogenético de <i>Citrus tristeza Virus</i> .....	42
Anotación del genoma de CTV .....	45
Capítulo 4: Discusión.....	46
Capítulo 5: Conclusiones.....	52

Capítulo 6: Recomendaciones.....	53
Referencias Bibliográficas .....	54
Anexos .....	61

**ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> <i>Primers utilizados para las ampliaciones por PCR</i> .....	34
<b>Tabla 2</b> <i>Condiciones de la PCR para la ampliación del control interno y del gen p6534</i>	
<b>Tabla 3</b> <i>Condiciones de la PCR para la ampliación del gen de la proteína de la cápside (CP)</i> .....	35
<b>Tabla 4</b> <i>Lista de las secuencias de genomas completos de CTV utilizados en este estudio</i> .....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Distribución mundial del Virus de la Tristeza de los Cítricos. En color tomate se muestran los países afectados</i> .....	20
<b>Figura 2</b> <i>Representación gráfica de la organización del genoma de CTV</i> .....	23
<b>Figura 3</b> <i>Árboles de limón Meyer (Citrus x meyeri) con sintomatología vírica</i> .....	31
<b>Figura 4</b> <i>Gel de agarosa con productos amplificados A) Muestras con amplificación para el control interno gen Nad5. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: control negativo, Carril 3: Muestra 1, Carril 4: Muestra 2, Carril 5: Muestra 3, Carril 6</i> .....	41
<b>Figura 5</b> <i>Cladograma mediante el método de Máxima Verosimilitud. El aislado ecuatoriano EC-Tumbaco se indica con una línea roja</i> .....	43
<b>Figura 6</b> <i>Reconstrucción filogenética de CTV mediante el método de Inferencia Bayesiana. El aislado ecuatoriano EC-Tumbaco se indica de color rojo</i> .....	44
<b>Figura 7</b> <i>Organización del genoma de Citrus tristeza virus aislado Tumbaco – Ecuador (N° accesión MZ870354)</i> .....	45

## RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el patógeno más agresivo de los cítricos, siendo el responsable de grandes pérdidas a nivel mundial. En el Ecuador, el limón Meyer (*Citrus x meyeri*) se ha logrado cultivar en todas las regiones agroecológicas convirtiéndose en un rubro importante para los agricultores. Mediante análisis previos se identificó la presencia de CTV en árboles de limón Meyer de la Granja Experimental del INIAP, sector Tumbaco, con sintomatología vírica. El genoma casi completo del CTV aislado tiene una longitud de 19,188 nucleótidos y está organizado en 12 secuencias codificantes. La secuencia del genoma fue anotada y depositada en la base de datos del GenBank con el número de accesión MZ870354. Los análisis filogenéticos se infirieron en la plataforma en línea CIPRES Science Gateway V. 3.3 con los programas RaxML y Beast. Los genomas utilizados en este estudio presentaron entre el 99.5% y 83,40% de identidad a nivel de nucleótidos. Los análisis filogenéticos permitieron inferir que el aislado ecuatoriano se agrupa con aislados de la región sudamericana. El aislado ecuatoriano puede tratarse de la cepa del grupo II del genotipo RB. Esta es la primera vez que se reporta un genoma casi completo de CTV descrito en el Ecuador.

### Palabras clave:

- CTV
- LIMÓN MEYER
- GENOMA
- BAYESIANO
- FILOGENIA

## ABSTRACT

*Citrus Tristeza Virus* (CTV) is the most aggressive pathogen on citrus crops, being responsible for tree losses around the world. In Ecuador, the Meyer lemon (*Citrus x meyeri*) is a citrus fruit that has adapted to different agro-ecological conditions, becoming an important item for farmers. The previous analysis allowed the identification of CTV in symptomatic Meyer lemon trees with virosis symptoms. The samples were collected at INIAP experimental farm located in Tumbaco-Pichincha province. The nearly complete genome of CTV is 19,188 bp long arranged in 12 open reading frames. The genome sequence was annotated and deposited in the GenBank database with accession number MZ870354. The phylogenetic relationships among CTV isolates were inferred using RaxML and Beast programs, on the online platform CIPRES Science Gateway V.3.3. The ecuadorian isolate was grouped with isolates from the South America region. The phylogenetic analysis grouped EC-Tumbaco isolate in RB genotype, group II. This is the first time that a nearly complete CTV genome has been reported in Ecuador.

### Keywords:

- CTV
- MEYER LEMON
- GENOME
- BAYESIAN
- PHYLOGENIE

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Tema

Caracterización molecular y filogenética del virus fitopatógeno *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco - Ecuador

### 1.2 Formulación del problema

El Ecuador es uno de los países con mayor diversidad de flora a nivel mundial, gracias a su estratégica posición geográfica y a la variabilidad de microclimas existentes, esto ha permitido la producción de variedades frutales tales como el limón. El limón Meyer (*Citrus x meyeri*) es una variedad que se puede adaptar a diferentes condiciones agroecológicas del Ecuador, logrando cultivarse tanto en los valles cálidos de la sierra, valles secos de la costa y ciertas zonas amazónicas, razón por la cual ha llegado a convertirse en un rubro importante para los agricultores. Según datos proporcionados por la FAO, en el Ecuador la producción de limón entre los años 2015 y 2019 fue de 19.700 tm (FAO, 2019).

Los cultivos de limón se ven afectados por el patógeno *Citrus tristeza virus* (CTV), considerado una de las enfermedades víricas que más daño ocasiona a las plantaciones de cítricos en el mundo (Moreno et al., 2008). Esta enfermedad ataca principalmente a la unión de las yemas de las plantas, pero algunas cepas de CTV provocan otros síntomas incluyendo picaduras de tallos, retraso en el crecimiento, productividad reducida y calidad deteriorada de la fruta de muchos cultivares, incluso



cuando están injertados en porta injertos tolerantes a la tristeza de los cítricos (Moreno et al., 2008).

Para la identificación del CTV así como de otros virus fitopatógenos, investigadores y especialistas han utilizado por varios años ensayos biológicos y métodos serológicos, sin embargo, hoy en día los métodos más usados por su alta sensibilidad son la reacción en cadena de polimerasa (PCR) junto con la secuenciación Sanger y secuenciación de alto rendimiento (HTS por sus siglas en inglés High throughput sequencing) (Valverde and De La Torre-Almaraz, 2017). La mayor ventaja de estos últimos métodos es que pueden proporcionar un estado viral completo de una planta, incluida información sobre infecciones mixtas de especies virales o variantes del virus (Bester et al., 2021). Además, se puede obtener información sobre la estructura, la ecología o la evolución de la población del virus, que permite diferenciar sus variantes que pueden contribuir de manera diferente a la etiología de la enfermedad (Bester et al., 2021).

La caracterización del genoma del CTV, así como la identificación de las variantes presentes en diferentes partes del mundo es esencial para desarrollar programas de protección contra este patógeno y contribuir al conocimiento sobre la diversidad del CTV. Con esta información la comunidad científica y gubernamental podrá elaborar planes de control para reducir pérdidas en la productividad y la calidad del cultivo de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en el Ecuador. Además, permitirá promover el uso de herramientas y recursos bioinformáticos como métodos rápidos y efectivos de diagnóstico en programas de cuarentena y de certificación de material vegetal.

### 1.3 Objetivos de la investigación

#### 1.3.1 *Objetivo general*

Caracterizar el virus *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador, mediante herramientas bioinformáticas y moleculares.

#### 1.3.2 *Objetivos específicos*

- Realizar la anotación de la secuencia genómica del *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador para su registro en la base de datos del GenBank.
- Analizar la secuencia genómica y reconstruir la historia evolutiva del genoma de CTV aislado de cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en la parroquia de Tumbaco – Ecuador mediante análisis filogenéticos.
- Confirmar mediante PCR convencional la presencia de CTV en los cultivos de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) de la parroquia de Tumbaco – Ecuador e identificar la cepa de la población viral con primers específicos.

### 1.4 Marco Teórico

#### 1.4.1 *El cultivo de limón en Ecuador*

En el Ecuador el cultivo de limón se realiza en todo el territorio, localizándose principalmente en la provincia de El Oro con una superficie cultivada de 935 Ha. plantadas y una producción anual de 7.010 Tm (INEC, 2020). Alrededor del 90% de

la producción de limón en Ecuador se realiza por pequeños y medianos agricultores, considerando esta actividad como una alternativa agrícola y socioeconómica (Llumiyinga, 2010, Ladino, 2020). Las variedades de limón que se cultivan en el Ecuador, según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos-INEC (2016), son el limón criollo o Sutil (*Citrus aurantifolia*) y el limón Tahití o Pérsico (*Citrus latifolia*) y limón Meyer (*Citrus meyeri*), tanto para consumo local como para exportación (Valarezo, 2020).

La variedad Meyer (*Citrus meyerii*) es un híbrido originario de China, el cual resulta de la cruce entre el limón (*Citrus limón*) y la mandarina (*Citrus reticulata*) (Medina, 2007, Valarezo, 2020). Es un árbol pequeño, con espinas, sus hojas son de color verde oscuro y su floración es perenne a temperaturas cálidas, pero puede entrar en latencia a temperaturas bajo los 12°C. El fruto es de color amarillo, redondo, de tamaño mediano a grande, su sabor es agradable, moderadamente ácido, por ello es utilizado para el consumo doméstico (Valarezo, 2020). El limón Meyer se adapta a climas templados, cálidos y subtropicales, en Ecuador las zonas con mayor aptitud para la producción del limón Meyer son los valles de Portoviejo, Puyo, Nueva Loja Puerto Quito, Chota, Guayllabamba, San José de Minas, Valle de los Chillos y Tumbaco (Medina, 2007). Por su fácil adaptación esta variedad Meyer ha llegado a convertirse en un rubro importante para los agricultores del país.

El cultivo de limón se puede ver amenazado por factores bióticos y abióticos que comprometen negativamente la calidad y volumen de producción de la fruta. La salinidad, sequías, heladas, son fenómenos abióticos, mientras que entre los factores abióticos se encuentran la presencia de ciertos patógenos que han comprometido el cultivo de limón, tal es el caso del virus de la tristeza de los cítricos.

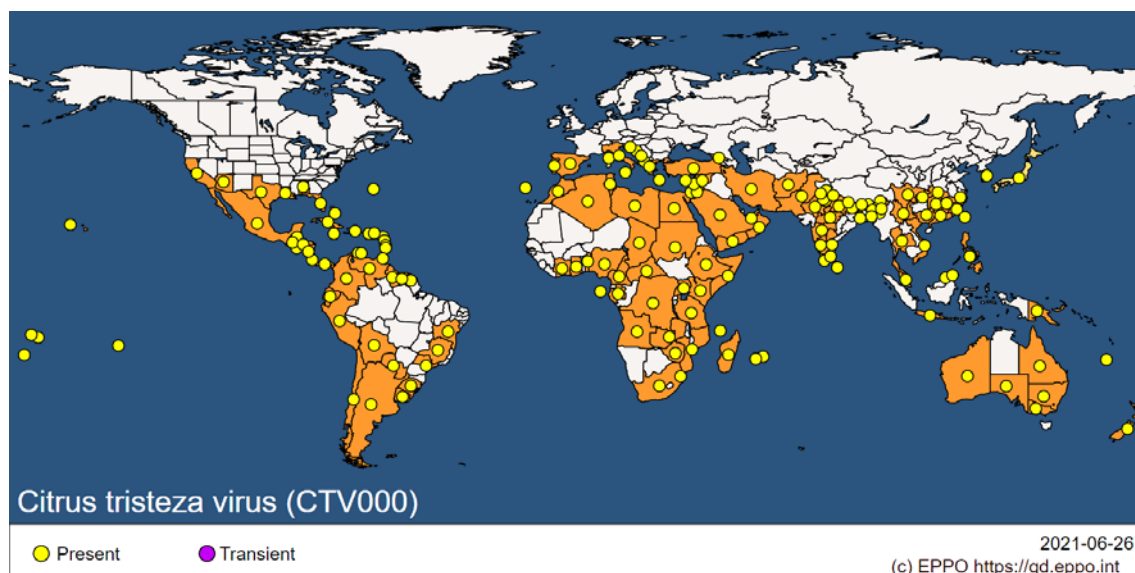
### 1.4.2 *Virus de la Tristeza de los Cítricos*

El virus de la tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV) es el patógeno viral más grave de los cítricos y ha sido el responsable de la pérdida de más de 100 millones de árboles en los últimos 70 años (Moreno et al., 2008). Perteneció al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae* (Bester et al., 2021; Karasev et al., 1995)

Actualmente, el CTV se encuentra distribuido en todas las zonas cítricas del mundo, siendo endémico en Asia, África, América del Sur y gran parte de Centroamérica (EPPO, 2021) (Figura 1)

#### Figura 1

*Distribución mundial del Virus de la Tristeza de los Cítricos. En color tomate se muestran los países afectados*



La transmisión y dispersión del CTV a nuevas regiones ocurre de manera vertical por movimiento de plantas o por propagación vegetativa, cuando se injertan yemas de cítricos infectadas sobre un patrón, mientras que a nivel local la dispersión puede

ocurrir mediante vectores generalmente especies de áfidos como *Toxoptera citricida* y *Aphis gossypii* (Dawson et al., 2015a; Moreno et al., 2008). Según el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), en el Ecuador se ha identificado la presencia del pulgón negro (*Toxoptera aurantii*) en las regiones Costa, Sierra, Amazonía y Galápagos. Las ninfas y adultos se alimentan de la sabia de las hojas jóvenes y brotes, causando deformación y deteniendo su desarrollo. Además, segregan sustancias azucaradas que permiten la proliferación del hongo de la "fumagina" y son los principales transmisores de enfermedades virosas (Valarezo et al., 2011).

La transmisión por áfidos puede provocar alteraciones sobre las poblaciones virales generando la gran diversidad de cepas del CTV que lo destaca de entre la mayoría de virus (Dawson et al., 2015a; Folimonova et al., 2020). En efecto, dependiendo del aislado de virus y la combinación de variedad / portainjerto, las cepas de CTV pueden causar diferentes síndromes en el campo como "declive" (QD) o "picadura del tallo" (SP). Algunos aislados de CTV inducen un tercer síndrome, en condiciones de invernadero, que se conoce como "plántulas amarillas" (SY). Además, CTV causa diferentes combinaciones de síntomas en plantas indicadoras dependiendo de la cepa de CTV, o la mezcla de cepas, presente en la planta huésped. (Albiach-Marti, 2013; Harper, 2013).

#### 1.4.3 **Estructura y organización genómica del CTV**

El virión del CTV consiste en largas partículas flexuosas y filamentosas con un tamaño de 2,000 nm×10–12 nm (Dawson et al., 2015a). La cubierta del virus está formada por dos proteínas de cápside, una cubierta mayor de 25 kDa (p25, CP) que

cubre aproximadamente el 97% del virión y una cubierta menor (p27, CPm) que cubre el 3% restante (Dawson et al., 2015a).

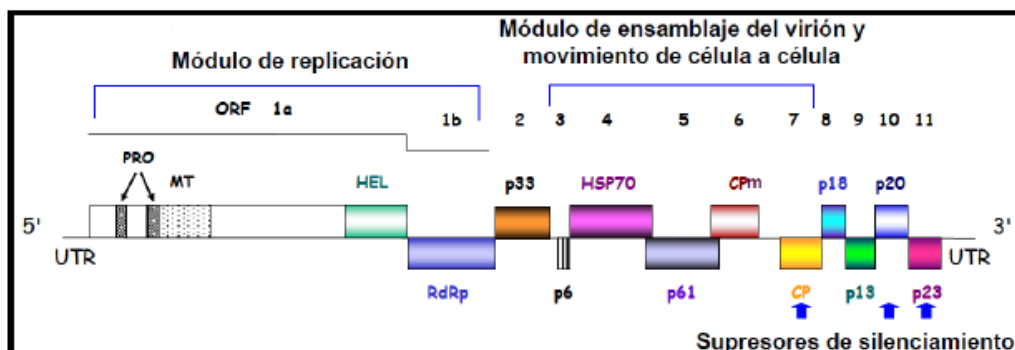
El genoma del CTV consiste en una molécula de ARN monocatenario de polaridad positiva de aproximadamente 19,3 kb (Bester et al., 2021; Karasev et al., 1995). Está organizado en 12 marcos de lectura abiertos (Open Reading Frames, ORFs), flanqueados por dos regiones no traducidas (Untranslated Regions, UTR) en los extremos 5' y 3' de 107 y 273 nucleótidos, respectivamente (Karasev et al., 1995).

Las proteínas del CTV se encuentran organizadas en distintas proporciones o módulos en el virión y poseen varias funciones. El módulo de replicación ocupa la mitad 5' del genoma del CTV y está conformado por los ORFs 1a y 1b que codifican para una poliproteína que incluye dominios papaín-proteasa (PRO), helicasa (HEL) y metiltransferasa (MET), así como una ARN polimerasa ARN dependiente (RdRp) (Karasev et al., 1995).

La otra mitad 3' del genoma del CTV está conformada por 10 ORF's cuyos productos son requeridos para el ensamblaje y movimiento. Los genes p6, p65, p61, p27 y p25 forman un bloque de cinco genes que se mantienen conservados en todos los miembros de la familia Closteroviridae; las proteínas p20 y p23 son supresoras del silenciamiento del RNA (Lu et al., 2004) y las proteínas p33, p13, p18 responsables de la infección en hospederos susceptibles ( Folimonova, 2020; Dawson et al., 2015; Karasev et al., 1995) (Figura 2).

**Figura 2**

*Representación gráfica de la organización del genoma de CTV*



Los genes p61 y p65 trabajan en conjunto y codifican proteínas encargadas del ensamblaje del virión, y actúan para restringir la encapsidación por la proteína de la cubierta menor al extremo 5' del virión (Satyanarayana et al., 2004). Además, se ha encontrado que ambos genes están involucrados en la transmisión de CTV a través de áfidos (Killiny et al., 2016).

#### 1.4.4 ***Evolución y variabilidad genética del CTV***

El CTV presenta dos mecanismos principales de evolución que son la mutación, debido a la falta de actividad correctora de la RNA polimerasa viral, y la recombinación (Dawson et al., 2015a; Harper, 2013). Se ha demostrado que la recombinación, más que la mutación, es el factor principal en la evolución de las cepas de CTV, produciendo tres de las seis cepas existentes con propiedades diferentes (Harper, 2013; Xiao-yun et al., 2012).

Las cepas de CTV se definen como linajes filogénicamente distintos que se clasifican en base al análisis de las secuencias genómicas virales (Folimonova, 2020; Harper, 2013). Los aislados de CTV al proceder de distintos hospederos y regiones

geográficas pueden presentar gran variabilidad genética (Moreno et al., 2008). Esta variabilidad genética podría ser el resultado de eventos de recombinación, mutación e infecciones mixtas, como resultado de la coexistencia durante varios años tanto del hospedero como del vector en campo (Iglesias et al., 2008). Gracias a las técnicas de secuenciación, se ha logrado identificar nuevos aislados permitiendo conocer la alta diversidad genética en la población del CTV, algunos aislados poseen una secuencia predominante y algunas variantes que están estrechamente relacionadas, mientras que otros tienen una estructura compleja con variantes de secuencias altamente divergentes (Ayllón et al., 2006). Las variantes del CTV están clasificadas en siete grandes grupos genotípicos o cepas: T3, T30, T36, VT, T68, RB y HA 16-5 (Dawson et al., 2015a; Harper, 2013). En la base de datos del GeneBank podemos encontrar alrededor de 67 secuencias genómicas completas del CTV procedentes de diferentes países, no todas ellas se han asociado con un perfil fenotípico (Catara et al., 2019). Algunos reportes publicados de diferentes partes del mundo muestran que varios aislados agresivos del CTV no dependen de portainjertos sensibles, sino que pueden aparecer como resultado de un reordenamiento o mutaciones del genoma (Benítez-Galeano et al., 2015; Catara et al., 2019). Por esta razón una identificación rápida y certera de la diversidad genética del virus sigue siendo fundamental para la prospección de áreas terrestres específicas.

En general, la mayor variabilidad genética del CTV se ubica hacia la mitad del genoma en el extremo 5'. Se ha identificado los sitios calientes (hotspots) de recombinación dentro del genoma del CTV, siendo estos ubicados entre el ORF1b y el gen p33 y dentro del ORF1a (Xiao-yun et al., 2012). Los genes de la cápside han sido utilizados para la diferenciación de especies del virus ya que es más conservado que otros genes. Ambos ORF para la CP y CPM están localizados en el extremo



3' terminal del genoma del CTV el cual posee menor diversidad de nucleótidos y sufre menos eventos de recombinación del ARN (Xiao-yun et al., 2012)

#### 1.4.5 **Filogenia**

La filogenia es el estudio de las relaciones evolutivas. Los análisis filogenéticos nos permiten entender las relaciones evolutivas de secuencias o especies, calcular las distancias entre ellos y además si descienden o no de un ancestro en común. Estos análisis tienen la finalidad de estimar un árbol filogenético que muestre la historia evolutiva de un grupo taxonómico en estudio (Peña, 2011).

##### 1.4.5.1 **Métodos para construir árboles filogenéticos**

El primer paso para construir árboles filogenéticos es el alineamiento de secuencias, que consiste en identificar secuencias homólogas, que puede ser en pares cuando se comparan dos secuencias al mismo tiempo o también puede ser un alineamiento múltiple cuando más de dos secuencias son comparadas (Munjal et al., 2019).

Los métodos comúnmente utilizados en estudios de sistemática filogenética son: a) la Cladística, usando el principio de Máxima Parsimonia (MP); b) Maximum Likelihood (ML), c) Inferencia Bayesiana (IB) y d) el método Neighbor-Joining (NJ).

**Neighbor-Joining (NJ):** Con este método se obtiene un árbol sin raíz y aditivo, en el cual se puede saber el cambio evolutivo mediante la longitud de sus ramas (Peña, 2011). Los individuos pertenecientes a una misma especie formarán grupos aislados debido a su alto nivel de semejanza. Un árbol filogenético construido mediante este método no refleja relaciones evolutivas, sino más bien es una representación del grado de similitud de los individuos terminales (Peña, 2011).

**Máxima Parsimonia (MP):** Con este método se puede elegir un cladograma o árbol filogenético que explique una filogenia de un grupo de individuos que poseen el menor número de cambios evolutivos. Provee información evolutiva y árboles más confiables (Rodríguez Tello, 2013)

**Máxima Verosimilitud (ML):** Este método es exhaustivo, permite seleccionar el mejor árbol mediante modelos probabilísticos, por ejemplo, aquel que tenga la más alta probabilidad (verosimilitud) de reflejar el proceso evolutivo real (Rodríguez Tello, 2013).

**Inferencia Bayesiana (IB):** Este método calcula una probabilidad posterior para cada árbol posible dado un modelo de evolución y unas observaciones. Utiliza datos observados, que pueden ser una serie de secuencias y probabilidades a priori para generar unas probabilidades tanto para el conjunto de posibles árboles como para los parámetros del modelo de mutación. Para este método es importante elegir el modelo de mutación antes de comenzar la reconstrucción filogenética (Peña, 2011).

#### 1.4.6 ***Métodos de diagnóstico e identificación del CTV***

La detección e identificación del CTV puede realizarse mediante observación con microscopio electrónico, usando test biológicos, serológicos, moleculares y últimamente mediante secuenciación de siguiente generación (NGS), y tercera generación (TGS) (Catara et al., 2019). El diagnóstico oportuno del virus, su detección e identificación tanto en plantas como en vectores, desempeñan un papel fundamental en el manejo de la enfermedad (Naidu and Hughes, 2018).

#### **1.4.6.1 ELISA (*Ensayo de inmunoabsorción ligada a enzimas*)**

La técnica de ELISA proporciona un diagnóstico con un alto nivel de sensibilidad y bajo costo (Cambra et al., 2000). Entre las variantes de la técnica inmunoenzimática ELISA (directa, indirecta y “sandwich”) la más utilizada para la detección de patógenos en vegetales es la ELISA tipo “sandwich” que habitualmente se utiliza en su forma DAS (Double Antibody Sandwich) (Cambra et al., 2000). Para la reacción se emplea una inmunoglobulina del virus marcada con una enzima (generalmente fosfatasa alcalina) que reaccionan con el virus de la tristeza en el caso de estar presente en la muestra. El revelado de la reacción ocurre luego de añadir el sustrato específico sobre el cual actúa la enzima marcadora y produce la coloración solo en presencia del virus, la misma que es proporcional a la cantidad de antígenos fijados en el pocillo y la lectura puede ser visual o mediante colorimetría a 405 nm (Cambra et al., 2000).

Se ha demostrado que esta técnica puede tener una baja sensibilidad para detectar el virus en plantas muestreadas durante la época de verano (Bar-Joseph, M., et al., 1979). Otra desventaja de esta técnica es que se limita a la utilización de muestras ricas en floema como los peciolo (Bar-Joseph, M., et al., 1979; Moreno et al., 2008).

#### **1.4.6.2 PCR de transcripción inversa (*RT-PCR*)**

La técnica de RT-PCR es rápida, específica y reproducible (Cambra et al., 2000). En comparación con los test de ELISA, este método es más sensible especialmente en aquellos casos en donde la concentración de CTV en la planta huésped es baja además, permite detectar el virus tanto en tejidos secos como frescos (Bar-Joseph, et al., 1979; Hung et al., 2000).

Más recientemente, se ha desarrollado la técnica de RT-LAMP (amplificación isotérmica mediada por bucle de transcripción inversa) la cual es simple y rápida para la detección sensible del virus de la tristeza de los cítricos (Ghosh et al., 2019; Warghane et al., 2017).

#### **1.4.6.3      *Secuenciación de próxima generación (NGS)***

El advenimiento de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) también conocida como secuenciación de siguiente generación (NGS) ha revolucionado la identificación del virus en plantas. Entre las tecnologías de secuenciación más utilizadas se encuentran la Illumina, Roche 454, Pacific Biosciences, y más reciente la de Oxford Nanopore MinION (Maree et al., 2018). Estas tecnologías muestran un amplio espectro de detección, sensibilidad y una cuantificación precisa (Maree et al., 2018; Rubio et al., 2020a), además ha sido muy útil para el estudio filogenético, identificación de nuevas cepas de CTV (Harper, 2013) y reconstrucción de genomas virales. Otra ventaja es que los datos de secuenciación obtenidos pueden ser analizados por múltiples usuarios finales o pueden volver a analizarse a medida que se amplían las bases de datos (Maree et al., 2018).

#### **1.4.7      *Análisis y Anotación genómica***

El desarrollo de las técnicas bioinformáticas desde mediados de los años 1990's y la obtención de datos masivos gracias a la secuenciación, marcan el comienzo para el estudio a profundidad de los genes y la anotación de genomas. La anotación de los genomas constituye un elemento importante para entender la biología de un organismo (Stein, 2001). Su principal objetivo es identificar las características claves del genoma de un organismo, en particular los genes y sus productos (Stein, 2001). A inicios de los años 2000, el avance en la publicación de genomas de referencia en

bases de datos como GenBank permitió anotar nuevos genomas mediante el alineamiento de secuencias homólogas de nucleótidos, mRNA y proteínas (Abril and Castellano, 2018). Desde esa fecha cientos de genomas han sido anotados permitiendo comprender de manera más precisa los elementos que dirigen los procesos biológicos de un organismo (Abril and Castellano, 2018). La anotación genómica puede realizarse a nivel de nucleótidos, proteínas y a nivel de procesos:

**Anotación a nivel de nucleótidos:** Consiste principalmente en la búsqueda de genes, para ello se utilizan métodos de predicción de genes ab initio y la comparación de secuencias con bases de datos y otros organismos (Stein, 2001). La predicción de ab initio se refiere a la identificación de genes que codifican proteínas utilizando las señales que definen y caracterizan sus estructuras génicas a lo largo del genoma como por ejemplo codones de inicio y finalización de la traducción, CDS, exones, intrones (Abril and Castellano, 2018). La anotación a nivel de nucleótidos también permite la integración de la secuencia del genoma con otros mapas genéticos y físicos del genoma.

**Anotación a nivel de proteínas:** El objetivo principal de la anotación a nivel de proteínas es asignar funciones a los productos del genoma. Las bases de datos de secuencias de proteínas y dominios y motivos funcionales son recursos poderosos para este tipo de anotación. Sin embargo, la mitad de las proteínas predichas en una nueva secuencia del genoma tienden a no tener una función obvia (Stein, 2001).

**Anotación a nivel de procesos:** Este tipo de anotación permite comprender la función de los genes y sus productos en el contexto de la fisiología celular y del organismo. Uno de los obstáculos a este nivel de anotación ha sido la inconsistencia de los términos utilizados por diferentes sistemas de modelos (Stein, 2001).

Algunos programas computacionales han sido desarrollados para permitir la anotación de genomas de manera fácil y rápida en base a genomas de referencia, tales como GENEIOUS, GENEMARK y GLIMMER (Lukashin and Borodovsky, 1998) los cuales realizan análisis ab initio para predecir genes de genomas procariotas usando como modelo cadenas Markov (HMM) de orden cinco – modelo estocástico (es decir, aleatorio) desarrollado dentro de la teoría de la probabilidad y la estadística que establece una fuerte dependencia entre un evento y otro suceso anterior (Abril and Castellano, 2018). Este modelo se basa en la probabilidades de que el siguiente nucleótido dependa de los cinco anteriores (Abril and Castellano, 2018). El programa GENEIOUS permite anotar de manera rápida genomas comparándolos con genomas de referencia (RefSeq) descritos en el GenBank.

## 1.5 HIPÓTESIS

El *Citrus tristeza virus* (CTV) aislado de Tumbaco-Ecuador se agrupa filogenéticamente con aislados procedentes de la región sudamericana.

## CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.6 Zona de estudio

La recolección de las muestras de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) con sintomatología vírica (mosaico, amarillamiento intervenal, ampollamiento, manchas cloróticas, deformación de brotes y tejido foliar) (Figura 3) se llevó a cabo en la Granja experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de la Provincia de Pichincha, ubicado en la Av. Interoceánica km 15 y Eloy Alfaro, sector Tumbaco con coordenadas de latitud 00°12'56"S y longitud 78°24'44"O a una altura de 2348 m.s.n.m.

#### Figura 3

Árboles de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) con sintomatología vírica



## **1.7 Análisis de laboratorio**

Los ensayos moleculares se realizaron en el Laboratorio privado de diagnóstico molecular IDgen, ubicado en la Avenida de los Granados, cantón Quito 170513, provincia de Pichincha, Ecuador.

## **1.8 Período de duración de la investigación**

La investigación inició el 27 de julio del 2021 y finalizó el 07 de diciembre del 2021.

## **1.9 Metodología**

### **1.9.1 *Diseño de primers***

Los primers se diseñaron utilizando el programa disponible en línea OligoPerfect (Thermo Fisher Scientific – US) y tomando como referencia la secuencia anotada del gen p65 del *Citrus tristeza virus* de Tumbaco. Una vez diseñados los primers, se verificó que cumplan con los parámetros óptimos (longitud, temperatura de melting, % de GC, termodinámica) en el programa OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Inc.).

### **1.9.2 *Obtención de muestras de hojas sintomáticas***

Se identificaron plantas enfermas mediante observación en campo y se recolectaron muestras de hojas con síntomas de virosis como, amarillamiento intervenal, deformación de brotes y clorosis. Las muestras fueron almacenadas en bolsas estériles y se transportaron manteniendo una cadena de frío hasta el laboratorio para su posterior análisis.



### 1.9.3 ***Limpieza y desinfección del tejido vegetal***

Se llevó a cabo un proceso de desinfección superficial de las muestras vegetales para retirar residuos de tierra y partículas gruesas usando abundante agua limpia. Luego, se sumergieron durante 30s en una solución de hipoclorito de sodio 0,5% y finalmente se enjuagaron en abundante agua estéril. Las muestras fueron cortadas en trozos pequeños dentro de un ambiente estéril, y almacenadas en tubos estériles de 1,5mL para después congelarlas.

### 1.9.4 ***Extracción de ARN***

Las muestras congeladas se trituraron con la ayuda de un mortero y un pistilo previamente esterilizados y congelados. Por cada 200mg de muestra se añadieron 75mg de PVP (polivinil pirrolidona). El producto pulverizado de este proceso se utilizó para la extracción de ARN, mediante el kit de extracción Total SV RNA Isolation System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las extracciones se almacenaron a -80°C.

### 1.9.5 ***Proceso de Transcripción inversa y Reacción en cadena de la Polimerasa (RT-PCR)***

Con el ARN extraído se procedió a la preparación del ADN complementario (ADNc) utilizando el kit OneScript Plus cDNA Synthesis Kit (ABM) según las indicaciones del fabricante, con 5 µL de ARN en un volumen total de reacción de 20 µL. El ADNc obtenido se utilizó para realizar las amplificaciones por PCR con los primers descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Primers utilizados para las amplificaciones por PCR*

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Referencia</b>
<b>Nad5_F/Nad5_R</b>	ATCTCCAGTCACCAACATTG GCAT GCTTCTTGGGGCTTCTTGTT CGATA	185 pb	Huang et., al (2010)
<b>CP_F/CP_R</b>	TTATGGACGACGAGACAAAG A CCAAGCTGCCTGACATTAGT	655 pb	Hung, et al., (2000)
<b>CTVEc_F/CTVEc_R</b>	TTACGATTTTCGGCGGTGGAA TAGGTACGAGCTTCCACCGA	400 pb	Diseñados en este trabajo

En la Tabla 2 y 3 se muestran las condiciones y parámetros de PCR empleados para la amplificación con cada uno de los pares de primers.

**Tabla 2**

*Condiciones de la PCR para la amplificación del control interno y del gen p65*

<b>Ciclos PCR</b>	<b>Primers Nad5_F/Nad5_R (control interno)</b>	<b>Primers CTVEc_F/CTVEc_R (gen p65)</b>
Desnaturalización inicial	94°C por 3 min	94°C por 5 min
Desnaturalización	94°C por 30 s	94°C por 30 s
Hibridación	56°C por 30 s	54°C por 45 s
Extensión	72°C por 1 min	72°C por 45 s
Extensión final	72°C por 5 min	72°C por 5 min
Número de ciclos	35	35

**Tabla 3**

*Condiciones de la PCR para la amplificación del gen de la proteína de la cápside (CP)*

<b>Ciclos PCR</b>	<b>Primers CP_F/CP_R (gen CP)</b>
Desnaturalización inicial	94°C por 3 min
Número de ciclos	10
Desnaturalización	94°C por 30 s
Hibridación	55°C por 30 s
Extensión 1	72°C por 45 s
Número de ciclos	20
Desnaturalización	94°C por 30 s
Hibridación	55°C por 30 s
Extensión 2	72°C por 90 s
Extensión final	72°C por 7 min

Los amplicones resultantes fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% a 85V durante 30min.

#### 1.9.6 ***Anotación del genoma del CTV***

La secuencia del genoma casi completo del *Citrus tristeza virus* de Tumbaco fue obtenido inicialmente por Ramos, 2018 mediante secuenciación masiva paralela *Illumina* y ensamblado con el ensamblador SPAdes. La secuencia del genoma fue

anotada manualmente y con ayuda del programa GENIOUS Prime v5.8 (<https://www.geneious.com/free-trial/>). Se tomó como referencia la secuencia Refseq del genoma completo de CTV con número de accesión NC\_001661.1 obtenida de la base de datos del GenBank. Las coordenadas de inicio y fin para cada región del genoma se subieron al portal de la base de datos del GenBank con la herramienta BankIt (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/about/bankit/>).

#### 1.9.7 ***Alineamiento múltiple de secuencias***

Se realizó una búsqueda de secuencias similares con la herramienta BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), tomando como query la secuencia del genoma de CTV Tumbaco. De las secuencias que presentaron los alineamientos más significativos en BLASTN, se seleccionaron 43 secuencias de genomas completos de CTV, provenientes de distintas partes del mundo incluyendo secuencias reportadas de países como Brasil y Uruguay para hacer una comparación a nivel regional. (Tabla 4). Luego, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGAX v10.2.6) (Kumar et al., 2018), a través del método MUSCLE, utilizando los valores predeterminados para los parámetros como gap opening penalty (GOP) = -400, gap extension penalty (GEP) = 0,00 y cluster method = UPGMA. El resultado del alineamiento se analizó con el programa Gblock Server (Castresana, 2000), para eliminar posibles posiciones variables o gaps que interfirieran en el análisis filogenético.

**Tabla 4**

*Lista de las secuencias de genomas completos de CTV utilizados en este estudio*

<b>AISLADO</b>	<b>N° DE ACCESIÓN</b>	<b>PAÍS</b>	<b>*GENOTIPO</b>
CA-RB-AT35	KU358530. 1	USA- California	RB-II
B390-5	KU883265. 1	Sudáfrica	RB-II
DSST-17	MH186146 .1	Uruguay	RB-II
CSL01	KY110737. 1	Brasil	RB-II
CN-RB-9	MH558665 .1	China	RB-II
Taiwan- Pum/SP/T1	JX266712. 1	Taiwan	RB-II
HA18-9	GQ454869 .1	Hawaii	RB-II
NZRB-M17	FJ525434. 1	Nueva Zelanda	RB-I
CA-RB-AT25	KU356770. 1	USA- Fillmore	RB-I
NZRB-TH28	FJ525433. 1	Nueva Zelanda	RB-I
B301	JF957196. 1	Puerto Rico	RB-I
NZRB-G90	FJ525432. 1	Nueva Zelanda	RB-I
FS674-T36	KC517485. 1	USA	T36
Mac25	KR263170. 1	Italia	T36
Qaha from Egypt	AY340974. 1	Egipto	T36
Mexico	DQ272579. 1	México	T36
A18	JQ798289. 1	Tailandia- Chiang Mai	A18
HA16-5	GQ454870 .1	USA	HA16-5
FS701-T30	KC517489. 1	USA	T30
Bau282	KC748391. 1	Italia	T30
T385	Y18420.1	España	T30
FL278-T30	KC517490. 1	USA	T30

N4	MK779711. 1	China	T30
FS703-T30	KC517491. 1	USA- Florida	T30
702 5a	MH279618 .1	USA- California	T30
Kpg 3	HM573451 .1	India	VT
Taiwan- Pum/M/T5	JX266713. 1	Taiwan	HA16-5
T318A	DQ151548. 1	España	VT
SG29	KC748392. 1	Italia	VT
CSL02	KY110738. 1	Brasil	VT
Mac39	KJ790175. 1	Italia	VT
L192GR	KC262793. 1	Grecia	VT
CA-VT-AT39	KU361339. 1	USA- California	VT
HU-PSTS	KU720382. 1	China	VT
T3	KC525952. 1	USA	T3
SP	EU857538. 1	Nueva Zelanda	T3
NZ-B18	FJ525436. 1	Nueva Zelanda	T68
GFMS12-8	MK033511. 2	Sudáfrica	T68
GFMS12-7	MT350595. 1	Sudáfrica	T68
B165	EU076703. 3	India	T68
GFMS12_Dunca n	MT350597. 1	Sudáfrica	T68
LMS6-6	KU883267. 1	Sudáfrica	HA16-5

*Nota: \*El genotipo esta descrito según la clasificación de Harper et al., 2013 y Yokomi et al., 2017*

#### 1.9.8 ***Análisis filogenético para CTV***

Los análisis filogenéticos se realizaron con la plataforma en línea CIPRES Science Gateway V. 3.3. utilizando dos metodologías diferentes: Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, mediante el programa RaxML y BEAST respectivamente. El cálculo del mejor modelo de evolución se realizó en el programa MEGAX 10.2.6.

Para el análisis de inferencia bayesiana se utilizaron los programas del paquete BEAST v1.10.4: BEAUTI, BEAGLE, TreeAnnotator y LogCombiner. Se realizaron dos corridas del mismo análisis con el programa BEAUTI para comprobar que el árbol haya llegado a una zona de alta verosimilitud.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 1.10 Análisis molecular mediante amplificación por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizaron los primers descritos en bibliografía, así como los diseñados en este estudio. Durante el diseño de los primers, el programa OligoPerfect (Thermo Fisher Scientific – US) arrojó cuatro posibles combinaciones de primers para el gen p65. Los primers seleccionados poseen una longitud de 20 nucleótidos, un porcentaje de GC de 50, y una temperatura de melting de 60.4°C. La termodinámica de los primers forward y reverse se revisó en el programa OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies, Inc.). El programa arrojó para el primer forward la formación de una posible estructura con valores de  $\Delta G$  (kcal.mole<sup>-1</sup>) de -1.41, mientras que para el primer reverse el programa arrojó la formación de tres posibles estructuras con valores de  $\Delta G$  (kcal.mole<sup>-1</sup>) de -0.62, -0.11 y -0,02.

También se analizó la tendencia del primer forward para formar homodímeros y heterodímeros; el programa arrojó 11 posibles homodímeros con valores de  $\Delta G$  entre -5.19 y -0.96 (kcal.mol<sup>-1</sup>), y 12 posibles heterodímeros con valores de  $\Delta G$  entre -6.68 y -1.57 (kcal.mol<sup>-1</sup>). Por otra parte, para el primer reverse el análisis de homodímeros arrojó 11 posibles homodímeros con valores de  $\Delta G$  entre -6.34 y -0.96 (kcal.mol<sup>-1</sup>). Así mismo, se analizó la tendencia del primer reverse para formar heterodímeros, el programa arrojó 10 posibles heterodímeros con valores de  $\Delta G$  entre -5.19 y -0.96 (kcal.mol<sup>-1</sup>).

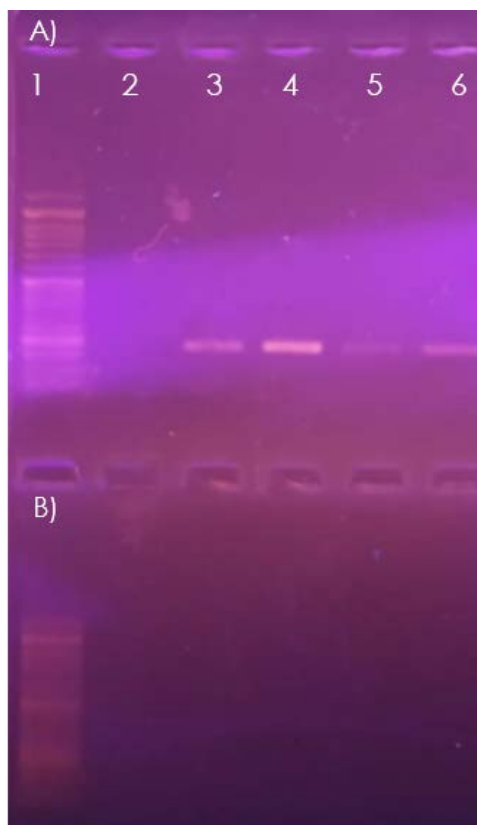


Previo a los ensayos de PCR, las muestras fueron enviadas a la Agencia de Regulación Fitosanitaria – AGROCALIDAD, para su análisis mediante la prueba TAS-ELISA, dando como resultado positivo para CTV (Ver ANEXO 1).

Los productos obtenidos de la amplificación del control interno fueron los esperados, con ello se confirmó la efectividad de la extracción de ARN y la síntesis de cDNA. Sin embargo, no se obtuvo amplificación con los primers correspondientes al gen p65 y a la proteína de la cápside (CP) (Ver Figura 4).

#### **Figura 4**

*Gel de agarosa con productos amplificados A) Muestras con amplificación para el control interno gen Nad5. Carril 1: marcador de peso molecular, Carril 2: control negativo, Carril 3: Muestra 1, Carril 4: Muestra 2, Carril 5: Muestra 3, Carril 6*



Se realizaron varias modificaciones en los protocolos para lograr la amplificación de los fragmentos deseados, como aumentos en la concentración de ARN para la síntesis de cDNA, gradientes de temperatura y variación en la concentración de reactivos en la PCR (datos no mostrados).

### **1.11 Análisis filogenético de *Citrus tristeza Virus***

Para el análisis filogenético mediante el método de Máxima Verosimilitud se tomaron como datos de entrada los 44 genomas completos de aislados de CTV obtenidos de la búsqueda en BLASTN (Ver Figura 5). Los genomas utilizados en este estudio presentaron entre el 99 y 83,40% de identidad a nivel de nucleótidos. Para la construcción del árbol se usó el modelo General Time Reversible (GTR) con una distribución gamma. El logaritmo de verosimilitud del mejor árbol fue de -122615.385811, utilizando un bootstrap de 1000. Con la finalidad de comparar las topologías de los árboles obtenidos mediante más de un método se realizó el mismo análisis mediante inferencia bayesiana. Las topologías de los árboles obtenidos mediante los dos métodos fueron congruentes (Ver Figura 6). Se pudo observar que el aislado CTV Tumbaco se agrupó con los aislados de USA-California (KU358530.1), Uruguay (MH186146.1), Brasil (KY110737.1), China (MH558665.1), Taiwán (JX266712.1), Sudáfrica (KU883265.1) y Hawái (GQ454869.1), con valores de soporte de Bootstrap de 100 y 1 para probabilidad posterior. Según la clasificación descrita por Yokomi *et al.*, 2017 este clado pertenece al grupo I del genotipo “resistance-breaking” (RB). Se determinó además que el aislado de CTV Tumbaco está cercanamente relacionado con el aislado de USA-California (KU358530.1).

**Figura 5**

Cladograma mediante el método de Máxima Verosimilitud. El aislado ecuatoriano EC-Tumbaco se indica con una línea roja

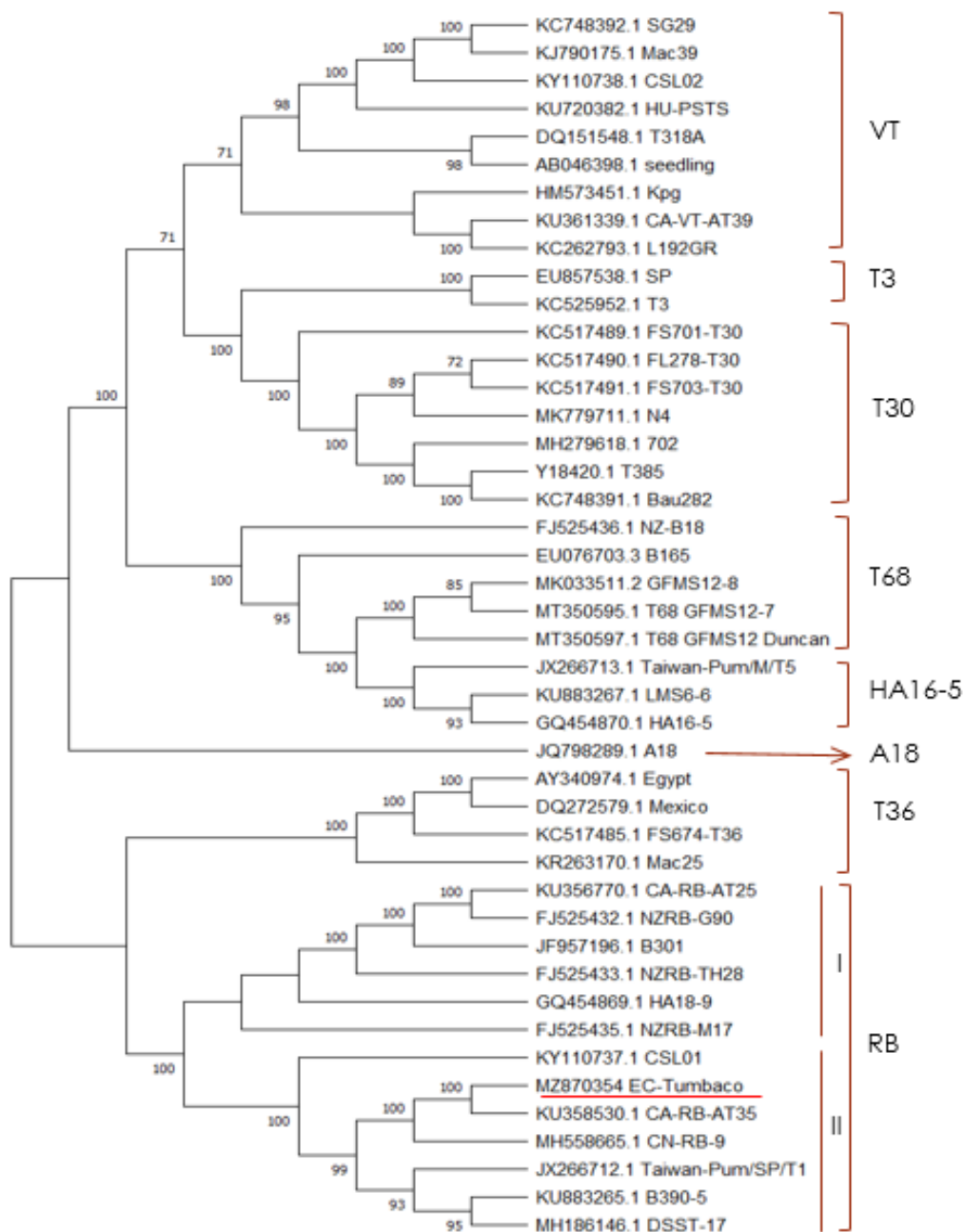
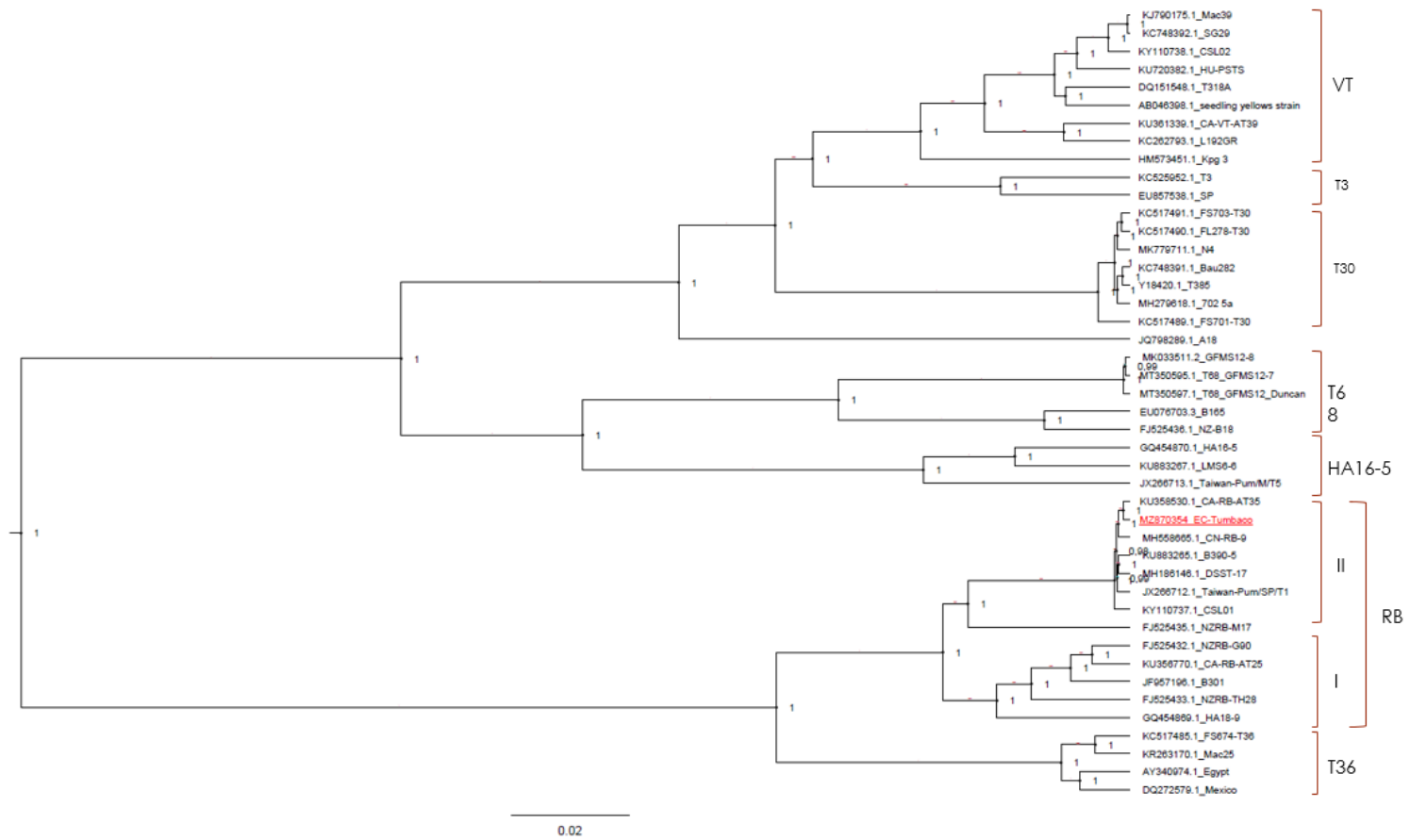


Figura 6

Reconstrucción filogenética de CTV mediante el método de Inferencia Bayesiana. El aislado ecuatoriano EC-Tumbaco se indica de color rojo

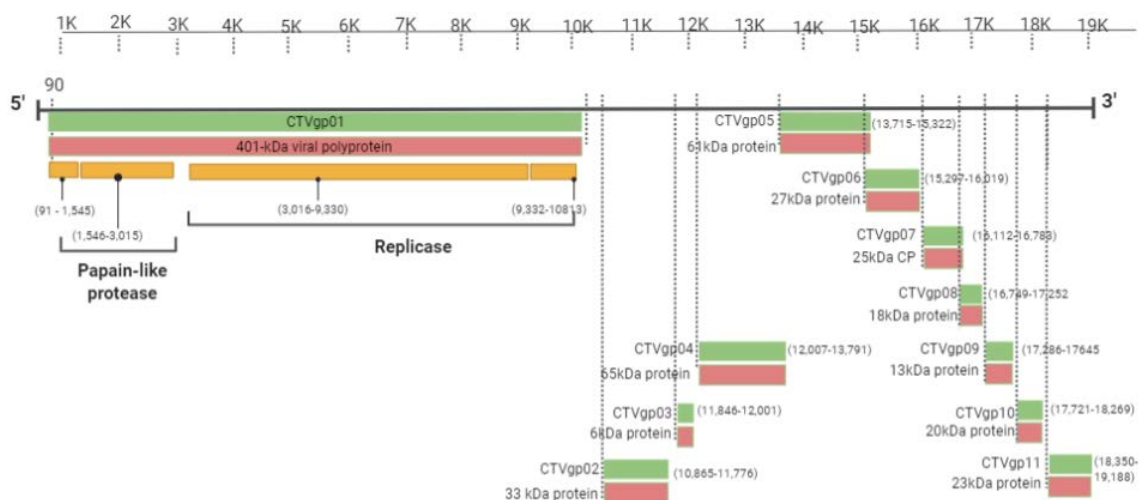


## 1.12 Anotación del genoma de CTV

La secuencia del genoma de CTV Tumbaco se registró en la base de datos del GenBank, con el número de accesoión **MZ870354**. Al realizar la anotación se pudo establecer que el genoma de CTV Tumbaco posee una longitud de 19.188 nucleótidos y 12 marcos de lectura abiertos (ORF's) (Ver Figura 7). El extremo 5'UTR posee 90 nucleótidos y el extremo 3'UTR posee 210 nucleótidos. El genoma posee los ORF's 1a y 1b que correspondientes al módulo de replicación y la poliproteína de 401 kDa, además, los genes del módulo del ensamblaje y transporte del virión (p6, p65, p61, p27 y p25), el grupo de los genes encargados de la infección a hospederos susceptibles (p33, p13, p18) y los genes p23 y p20 del grupo de supresores del silenciamiento del RNA.

**Figura 7**

*Organización del genoma de Citrus tristeza virus aislado Tumbaco – Ecuador (N° accesoión MZ870354)*



## CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se emplearon varias herramientas bioinformáticas para inferir la historia evolutiva y describir características genómicas y moleculares del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) aislado en Tumbaco. Los resultados permitieron conocer el virus y aportar con información para el manejo de esta plaga en campo.

El CTV es el agente causal de una de las enfermedades que mayor devastación ha causado a nivel mundial a plantaciones de cítricos incluidos naranjas, mandarinas, pomelos y limas (Dawson et al., 2015c; Moreno et al., 2008). El mayor impacto a nivel regional lo ha sufrido Argentina (1930), Brasil (1937), Venezuela (1980), reportándose también pérdidas significativas en California (1939), Florida (1951), España (1957) e Israel (1970) y la más reciente en Italia (2002) (Jones, 2021). Probablemente, el interés botánico y comercial de los cítricos llevó a la dispersión del CTV desde su sitio de origen, Asia, hacia otras regiones y continentes, poniendo al virus en interacción con nuevas variedades de hospederos, bajo diferentes condiciones ambientales y climáticas. Esta situación ha llevado a que surjan las variedades de cepas que hoy en día conocemos.

Desde el primer reporte de la secuenciación completa del genoma de CTV aislado T36 de Florida por Karasev y colaboradores, 1995 se conoce que este virus posee uno de los genomas de virus de plantas más grandes que van desde 19226 hasta 19306 nt., y 12 marcos de lectura abiertos que codifican para al menos 17 proteínas. Según la anotación del genoma ensamblado de CTV Tumbaco realizada en este

estudio, este coincide con la estructura de los genomas de referencia reportados para CTV (Harper, 2013; Karasev et al., 1995; Moreno et al., 2008).

Los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de genes virales han sido utilizados para la identificación de las cepas de CTV (Harper, 2013; Yokomi et al., 2017). En estos análisis se utilizan principalmente secuencias de los genes CP que se relacionan con la actividad biológica o el origen geográfico de las cepas. Por otro lado, las secuencias genómicas de las cepas CTV han mostrado que la región 3' es altamente conservada mientras que la región 5' presenta variaciones significativas (Folimonova, 2020). Es así que genes como el p65, p25, p20, p33 que corresponde a la replicación se encuentra ubicado hacia el extremo 3' por tal razón han sido seleccionados para ensayos RT-PCR para la clasificación e identificación de aislados de CTV (Benítez, 2014). En este estudio se utilizó el gen p65 y los genes de la cápside para el diseño de primers y la caracterización molecular del aislado ecuatoriano.

Un diagnóstico oportuno del virus ayuda a evitar su diseminación en campo y hacia otros cultivos. Se ha utilizado una amplia gama de métodos moleculares y serológicos para diferenciar entre diferentes cepas de CTV, incluida la hibridación molecular, inmunoensayos por ELISA, análisis de patrones de ARN bicatenario, análisis de fragmentos de restricción de ADNc de CTV amplificado, amplificación por RT-PCR de diferentes regiones del genoma, RT-PCR en tiempo real, secuenciación y microarreglos (Moreno et al., 2008; Rubio et al., 2020a; Yokomi et al., 2017). En esta investigación, la técnica de TAS-ELISA permitió identificar la presencia de CTV en las muestras de hoja recolectadas de árboles de limón Meyer con sintomatología vírica en la zona de muestreo. El ELISA es el análisis de rutina más popular debido

a su facilidad de realización y disponibilidad comercial de anticuerpos específicos para los principales virus vegetales (Rubio et al., 2020a).

La técnica de RT-PCR presenta una mayor sensibilidad que los métodos serológicos como el ELISA y además permite una posterior identificación y clasificación de las cepas de CTV (Rubio et al., 2020b; Saponari et al., 2008; Solano-Luna et al., 2018). En este trabajo se utilizó la técnica de RT-PCR para la detección de CTV, sin embargo, no se obtuvo amplificación de los fragmentos esperados para el gen p65 y la proteína de la cápside. Los primers se diseñaron en base a la secuencia del genoma del aislado CTV-Tumbaco del año 2018, y las RT-PCR se corrieron con muestras sintomáticas que se obtuvieron del mismo sector, pero de árboles diferentes. Debido a la alta diversidad genética del CTV (Dawson et al., 2015a; Harper, 2013; Moreno et al., 2008), probablemente durante estos años se produjo algún cambio (mutación, deleción, inserción) en la secuencia original del virus lo que provocó que los primers no pegaran en la secuencia diana. Al no poseer un control positivo del virus originalmente aislado, no se pudo comprobar si las muestras recolectadas en la presente fecha, eran las mismas del 2018. Las muestras utilizadas fueron hojas con sintomatología vírica como amarillamiento intervenal, ampollamiento, manchas cloróticas, deformación, pero se ha visto que la ubicación y tipo de tejido también es un factor importante a considerar durante el muestreo. En un estudio de identificación de CTV mediante qRT-PCR en Colombia se determinó que la mayor concentración del virus se puede encontrar en hojas del tercio superior de la planta, en células alargadas y jóvenes y en menor concentración en el tercio medio, en células redondas y viejas (Solano-Luna et al., 2018). Un factor importante a considerar para la ausencia de amplificación es la baja carga viral presente en las muestras. Benítez, 2014 reporta en su estudio la ausencia de amplificación para



ciertos aislados uruguayos, atribuyendo este particular a la baja carga viral de las muestras. La baja carga viral también puede ser el resultado de que el virus no haya establecido una infección sistémica en la planta. La expresión de ciertos genes de CTV están relacionados con la infección sistémica de las plantas de cítricos, tal es el caso de la proteína p33, que se ha visto que es necesaria para la infección sistémica de naranjos y limoneros (Albiach-Marti, 2013; Shilts et al., 2020). Generalmente, la variabilidad genética y biológica del CTV puede proporcionar resultados erróneos al intentar identificar cepas de CTV con otras técnicas distintas a la secuenciación (Bester et al., 2021).

Los resultados del análisis filogenético de genomas completos ubican al aislado de EC-Tumbaco en el clado correspondiente al genotipo RB según la clasificación de Yokomi y colaboradores, 2017. Además, el aislado EC-Tumbaco se encuentra cercanamente relacionado con el aislado CA-RB-AT35 de California (No. Accesoión KU358530.1) y con el cual comparten un 99% de identidad a nivel de nucleótidos. Esto nos sugiere que ambos aislados son los mismos a pesar de estar separados geográficamente y de haber sido recolectados en diferentes años EC-Tumbaco en el 2018 y CA-RB-AT35 en el 2008 (Ramos, 2018; Yokomi et al., 2017). Es importante considerar que el INIAP dentro del Programa de Fruticultura en las Estaciones Experimentales de Tumbaco y Portoviejo, realizan trabajos de investigación en frutas tropicales y subtropicales con especies y variedades introducidas de cítricos (naranjas, limones, mandarinas y toronjas) procedentes de la Universidad de California (Valarezo,2014). Probablemente, el saneamiento del material utilizado en este programa no fue el adecuado, ya que la mayoría de los aislados de *Citrus tristeza virus* (CTV) en California son biológicamente leves y asintomáticos en

cultivares comerciales de porta injertos tolerantes a CTV (Yokomi, 2017), motivo por el cual el virus CTV está presente en los árboles de la zona de muestreo.

Los análisis filogenéticos y de recombinación indican que al menos existen dos grupos de aislados que corresponden al genotipo RB en California (Yokomi et al., 2017). Según los resultados del análisis filogenético, el aislado de Tumbaco se ubicó en el grupo II del genotipo RB, junto con los aislados de la región sudamericana como Uruguay (DSST-17) y Brasil (CSL01) confirmando así la hipótesis planteada en el presente estudio. La presencia del genotipo RB ha sido descrita en varias regiones como República Dominicana (Matos et al., 2013), Hawaii (Melzer et al., 2010), Puerto Rico (Roy, 2013) y Sudáfrica (Scott et al. 2013). Se ha encontrado que los aislados del genotipo RB tienen sus orígenes en la región del Pacífico Asiático y su transmisión se debe principalmente a los áfidos (Harper, 2013). En el Ecuador se ha identificado la presencia del áfido *Toxospera aurantii* en zonas citrícolas de la Costa, Sierra, Amazonía y Galápagos, y se le atribuye como la principal causa de diseminación de enfermedades víricas como el CTV (Valarezo et al., 2011). Por tal motivo es importante el diseño de programas de saneamiento adecuados, que certifiquen el material vegetal y por otro lado implementar programas de protección para evitar pérdidas de árboles que afecten la economía de agricultores que se dedican a la producción de este importante cultivo.

Finalmente, el presente estudio permite promover el uso de herramientas y recursos bioinformáticos como métodos rápidos y efectivos de diagnóstico en programas de cuarentena y de certificación de material vegetal. La caracterización del genoma del CTV, así como la identificación de las variantes presentes en diferentes partes del mundo es esencial para desarrollar programas de protección contra este patógeno y

contribuir al conocimiento sobre la diversidad del CTV. Con esta información la comunidad científica y gubernamental puede elaborar planes de control para reducir pérdidas en la productividad y la calidad del cultivo de limón Meyer (*Citrus x meyeri*) en el Ecuador.

## CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Con este estudio se reporta por primera el genoma anotado del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) aislado en Tumbaco-Ecuador.

Mediante los análisis filogenéticos se logró inferir que el aislado de CTV Tumbaco se agrupa en un mismo clado con aislados de la región sudamericana Uruguay (MH186146.1) y Brasil (KY110737.1), y presenta un nodo robusto con valores de soporte de 100.

La topología de los árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de Máxima Verosimilitud y Bayesiano permitieron inferir que el aislado de CTV Tumbaco pertenece al grupo II del genotipo RB, y además que está cercanamente relacionado con el aislado de California (KU358530) con quien comparte un 99% de identidad a nivel de nucleótidos.

Las regiones del genoma correspondientes a los genes p65 y CP no permitieron la caracterización molecular del aislado de CTV Tumbaco.

## CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Estandarizar métodos moleculares con primers específicos para otras regiones conservadas del genoma de CTV que permitan el diagnóstico de las cepas de CTV presentes en Ecuador.

Continuar con el diagnóstico y caracterización filogenética y molecular de aislados de CTV que incluya a otras provincias del país productoras de limón Meyer para poder determinar si el genotipo RB es el único en el país o existe la presencia de otros genotipos o cepas.

Realizar muestreos en diferentes zonas citrícolas del Ecuador con la finalidad de mapear la prevalencia y distribución del CTV en el país.

Realizar la caracterización molecular de diferentes cepas de CTV de árboles con sintomatología leve, moderada y severa con la finalidad de diseñar programas de protección cruzada.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril, J.F., Castellano, S., 2018. Genome annotation, in: Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology: ABC of Bioinformatics. Elsevier, pp. 195–209. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.20226-4>

Albiach-Marti, M.R., 2013. The Complex Genetics of Citrus tristeza virus. Curr. Issues Mol. Virol. - Viral Genet. Biotechnol. Appl. <https://doi.org/10.5772/56122>

Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Gonsalves, D., Moscovitz, M., Purcifull, D. E., Clark, M. F., and Loebenstein, G., 1979. The Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Citrus Tristeza Virus. Phytopathology 69, 190. <https://doi.org/10.1094/phyto-69-190>

Benítez-Galeano, J.M., Rubio, L., Bertalmío, A., Maeso, D., Rivas, F., Colina, R., 2015. Phylogenetic Studies of the Three RNA Silencing Suppressor Genes of South American CTV Isolates Reveal the Circulation of a Novel Genetic Lineage. Viruses 7, 4152–4168. <https://doi.org/10.3390/v7072814>

Bester, R., Cook, G., Maree, H.J., 2021. Citrus Tristeza Virus Genotype Detection Using High-Throughput Sequencing. Viruses 13. <https://doi.org/10.3390/v13020168>

Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, a, Colomer, M., 2000. Routine Detection of Citrus Tristeza Virus by Direct Immunoprinting-ELISA Method Using Specific Monoclonal and Recombinant Antibodies. Proceeding 14th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. 34–41.

Castresana, J., 2000. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol. Biol. Evol.* 17, 540–552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>

Catara, A.F., Bar-Joshep, M., Licciardello, G., 2019. Citrus tristeza Virus. *Methods in Molecular Biology, Methods in Molecular Biology.* [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_9)

Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Moreno, P., 2015a. Citrus Tristeza Virus: Making an Ally from an Enemy. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 137–155. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>

Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Moreno, P., 2015b. Citrus Tristeza Virus: Making an Ally from an Enemy. *Annu. Rev. Phytopathol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>

Dawson, W.O., Bar-Joseph, M., Garnsey, S.M., Moreno, P., 2015c. Citrus Tristeza Virus: Making an Ally from an Enemy. *Annu. Rev. Phytopathol.* <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120012>

EPPO (2021) PQR-EPPO database on quarantine pest <http://gd.eppo.int>

Folimonova, S.Y., 2020. Citrus tristeza virus: A large RNA virus with complex biology turned into a valuable tool for crop protection. *PLoS Pathog.* 16. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008416>

Folimonova, S.Y., Achor, D., Bar-Joseph, M., 2020. Walking Together: Cross-Protection, Genome Conservation, and the Replication Machinery of Citrus tristeza virus. *Viruses.* <https://doi.org/10.3390/v12121353>

Ghosh, D.K., Warghane, A., Biswas, K.K., 2019. Rapid and Sensitive Detection of Citrus tristeza virus Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay, in: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 143–150. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9558-5_10)

Harper, S.J., 2013. Citrus tristeza virus: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Front. Microbiol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00093>

Hung, T.H., Wu, M.L., Su, H.J., 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of citrus tristeza virus. *J. Phytopathol.* 148, 469–475. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2000.00539.x>

Iglesias, N.G., Gago-Zachert, S.P., Robledo, G., Costa, N., Plata, M.I., Vera, O., Grau, O., 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>

INEC 2020, Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

Jones, R.A.C., 2021. Global Plant Virus Disease Pandemics and Epidemics. *Plants* 10, 1–41. <https://doi.org/10.3390/PLANTS10020233>

Karasev, A. V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O. V., Koonin, E. V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J., 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208, 511–520. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1182>



Killiny, N., Harper, S.J., Alfaress, S., El Mohtar, C., Dawson, W.O., 2016. Minor Coat and Heat Shock Proteins Are Involved in the Binding of Citrus Tristeza Virus to the Foregut of Its Aphid Vector, *Toxoptera citricida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6294. <https://doi.org/10.1128/AEM.01914-16>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S.W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15742–15747. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404940101>

Maree, H.J., Fox, A., Al Rwahnih, M., Boonham, N., Candresse, T., 2018. Application of hts for routine plant virus diagnostics: state of the art and challenges. *Front. Plant Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01082>

Matos, L. A., Hilf, M. E., Cayetano, X. A., Feliz, A. O., Harper, S. J., and Folimonova, S. Y. 2013. Dramatic change in Citrus tristeza virus populations in the Dominican Republic. *Plant Dis.* 97:339-345.

Medina, V. (2007). Determinación de las características físicas y químicas del Limón Meyer (*Citrus limon*).

Melzer, M. J., Borth, W. B., Sether, D. M., Ferreira, S., Gonsalves, D., and Hu, J. S. 2010. Genetic diversity and evidence for recent modular recombination in Hawaiian Citrus tristeza virus. *Virus Genes* 40:111-118.

Moreno, P., Ambrós, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J., Peña, L., 2008. Citrus tristeza virus: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol. Plant Pathol.* <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00455.x>

Munjal, G., Hanmandlu, M., Srivastava, S., 2019. Phylogenetics Algorithms and Applications, in: *Advances in Intelligent Systems and Computing*. Springer Verlag, pp. 187–194. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-5934-7\\_17](https://doi.org/10.1007/978-981-13-5934-7_17)

Naidu, R.A., Hughes, A., 2018. Methods for the detection of plant virus diseases.

Peña, C., 2011. Métodos de inferencia filogenética. *Rev. Peru. Biol.* 18, 265–267. <https://doi.org/10.15381/rpb.v18i2.243>

Rodriguez Tello, E., 2013. Construcción de árboles filogenéticos. Tamaulipas.

Rubio, L., Galipienso, L., Ferriol, I., 2020a. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01092>

Rubio, L., Galipienso, L., Ferriol, I., 2020b. Detection of Plant Viruses and Disease Management: Relevance of Genetic Diversity and Evolution. *Front. Plant Sci.* 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.01092/FULL>

Roy, A., Choudhary, N., Hartung, J. S., and Brlansky, R. H. 2013. The prevalence of the Citrus tristeza virus trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Dis.* 97:1227-1234.

Saponari, M., Manjunath, K., Yokomi, R.K., 2008. Quantitative detection of Citrus tristeza virus in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan®). *J. Virol. Methods* 147, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.07.026>

Satyanarayana, T., Gowda, S., Ayllón, M.A., Dawson, W.O., 2004. Closterovirus bipolar virion: Evidence for initiation of assembly by minor coat protein and its restriction to the genomic RNA 5' region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 799. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0307747100>

Scott, K. A., 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>

Shilts, T., El-Mohtar, C., Dawson, W.O., Killiny, N., 2020. Citrus tristeza virus P33 Protein Is Required for Efficient Transmission by the Aphid *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Kirkaldy). *Viruses* 2020, Vol. 12, Page 1131 12, 1131. <https://doi.org/10.3390/V12101131>

Solano-Luna, L.M., Chavarro-Mesa, E., Ángel-Díaz, J.E., 2018. PCR cuantitativa para la detección del virus de la tristeza de los cítricos en Colombia. *Cienc. y Agric.* 15, 7–18. <https://doi.org/10.19053/01228420.v15.n1.2018.7789>

Stein, L., 2001. Genome annotation: From sequence to biology. *Nat. Rev. Genet.* 2, 493–503. <https://doi.org/10.1038/35080529>

Valarezo, O., Cañarte, E., Navarrete, B., 2011. Plagas de los cítricos y su control biológico. Guía para su identificación en el campo. Boletín divulgativo No. 367. Portoviejo.

Valarezo Beltrón, C. O., Caicedo Camposano, Ó. G., Cadena Piedrahita, D. L., Alcívar Torres, L. A., odríguez Berrío, A., & Julca-Otiniano, A. (2020). Caracterización de fincas productoras de limón (*Citrus aurantifolia*) en Portoviejo, Ecuador. *Revista*

de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales, 7(1), 88–94.

Tomado de [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2409-16182020000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2409-16182020000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Valverde, R.A., De La Torre-Almaraz, R., 2017. Extraction and purification of large dsRNAs from virus-infected plants and fungi; applications in virus detection and identification . *Rev. Mex. Fitopatol.* .

Warghane, A., Misra, P., Bhose, S., Biswas, K.K., Sharma, A.K., Reddy, M.K., Ghosh, D.K., 2017. Development of a simple and rapid reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for sensitive detection of Citrus tristeza virus. *J. Virol. Methods* 250, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.09.018>

Xiao-yun, W., Xiao-fei, C., Lu, L., Xiao-xia, W., 2012. Genetic Diversity and Global Distribution of Citrus tristeza virus (CTV) Strains. *J. Northeast Agric. Univ. (English Ed.* 19, 9–18. [https://doi.org/10.1016/s1006-8104\(13\)60031-8](https://doi.org/10.1016/s1006-8104(13)60031-8)

Yokomi, R.K., Selvaraj, V., Maheshwari, Y., Saponari, M., Giampetruzzi, A., Chiumenti, M., Hajeri, S., 2017. Identification and characterization of Citrus tristeza virus isolates breaking resistance in Trifoliate Orange in California. *Phytopathology* 107, 901–908. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0007-R>

**ANEXOS**