

Estudio de la población del virus de la tristeza de los cítricos en cultivares de limoneros injertados en naranjo agrio y *Citrus macrophylla*

M. F. Palacios*, J. Figueroa*, L. Foguet*, L. Villafañe* y B. Stein*

RESUMEN

El virus de la tristeza de los cítricos (CTV) es el agente causal de la enfermedad de la tristeza, reportada por primera vez en Argentina en 1930. El vector más eficiente, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), está presente en el país, la enfermedad es endémica, y por lo tanto las plantaciones se realizan con combinaciones tolerantes copa/portainjerto. Las plantas de limonero (*Citrus limon* (L) Burm f.) injertadas en naranjo agrio (*Citrus x aurantium*, L.) son asintomáticas y su desarrollo y producción no son afectados por el virus. Sin embargo, cuando el limonero se injerta en *Citrus macrophylla* (Wester) se manifiestan en el portainjerto síntomas severos de acanaladuras o "stem pitting" en la parte aérea y raíces, y detención del crecimiento del árbol. Existen diversas cepas o genotipos de CTV que difieren en su habilidad de desplazamiento y multiplicación según la especie del hospedero, que ejerce una fuerte presión selectiva sobre el virus. Debido a esto, el objetivo de este estudio fue comparar la población del virus en diferentes cultivares de limonero injertados en naranjo agrio y en *C. macrophylla* en un ensayo de campo plantado en diciembre de 2013 y expuesto a infección natural. Los genotipos del virus presente se detectaron mediante la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando cinco juegos de cebadores específicos de genotipos de CTV (T30, RB, B165, T3 y VT). Los genotipos T3 y RB se detectaron en todas las muestras analizadas, mientras que el T30 estuvo ausente. Por su parte, el genotipo B165 se detectó por primera vez en limonero en la región del noroeste argentino y estuvo presente en el 85% de las muestras examinadas en todos los cultivares. Algunos limoneros injertados en naranjo agrio mostraron una menor concentración de T3 y/o ausencia del genotipo VT, ambos considerados severos y presentes en todas las muestras de limonero en *C. macrophylla*. A pesar de estas diferencias puntuales, en líneas generales la infección natural y composición de la población de CTV fue muy homogénea en todas las plantas del ensayo, independientemente del portainjerto, por lo que estos resultados indican que *C. macrophylla* es susceptible a los genotipos detectados.

Palabras clave: CTV, genotipo, RT-PCR.

ABSTRACT

Study of the Citrus Tristeza Virus population in cultivars of lemon trees grafted into sour orange and *Citrus macrophylla*

Citrus tristeza virus (CTV) is the causal agent of the Tristeza disease, reported for the first time in Argentina in 1930. The most efficient vector, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy), is present in the country and therefore citrus plants are made with tolerant combinations variety / rootstock. Lemon plants (*Citrus limon* (L) Burm f.) grafted on sour orange (*Citrus x aurantium*, L.) are asymptomatic and yield and growth are not affected by the virus. However, when lemon is grafted on *Citrus macrophylla* (Wester) the rootstock is severely affected by stem pitting and the tree becomes stunted. There are diverse CTV strains that differ in their ability to move and accumulate in different host species, and that host species exerts strong selective pressure on the virus. Because of this, the objective of this study was to compare the CTV population of different lemon cultivars grafted on sour orange and *C. macrophylla* in a field trial planted in December 2013 and exposed to natural infection. The strains of the virus presents were detected by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) using five sets of specific primers of CTV genotypes (T30, RB, B165, T3 and VT). The T3 and RB genotypes were detected in all the analyzed samples, while the T30 genotype was absent. Some lemon trees grafted on sour orange showed a lower concentration of T3 and / or absence of the VT genotype, both considered severe and present in all lemon tree samples in *C. macrophylla*. The genotype B165 was found for the first time in lemon in the northwestern Argentina, and it was present in 85% of the samples analyzed, in all cultivars. The natural infection and composition of the CTV population were very homogeneous in all plants of the trial, regardless of the rootstock. Results would indicate that *C. macrophylla* is susceptible to the genotypes detected.

Key words: CTV, genotype, RT-PCR.

Fecha de recepción: 21/08/2019 - Fecha de aceptación: 17/01/2020

*Sección Centro de Saneamiento de Citrus. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Las Talitas, Tucumán, Argentina.
saneamiento@eeaoc.org.ar

INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos es la enfermedad viral más importante de los cítricos en todo el mundo, responsable de la muerte de millones de naranjos, pomelos y mandarinos injertados sobre naranjo agrio (*Citrus x aurantium*, L.) (Bar-Joseph *et al.* 1989). El virus de la tristeza de los cítricos (CTV por sus siglas en inglés) es el agente causal de esta enfermedad y posee el genoma más largo (19.296 nt) (Karasev *et al.*, 1995) y la estructura más grande que cualquier virus de planta de ARN de simple cadena (Coffin y Coutts, 1993). Se encuentra recubierto de dos proteínas capsídicas diferentes de 25 y 27 KDa (Martín *et al.*, 2009) que protegen su ARN genómico, el que contiene 12 marcos de lectura abierta que codifican al menos 19 proteínas (Karasev, 2000).

Diferentes aislamientos de CTV se clasifican en grupos basados en la similitud de su secuencia genética, los que se han definido como cepas o genotipos designados como: T36, VT, T3, RB, T68, T30, HA16-5, y una nueva cepa denominada S1 (Dawson *et al.*, 2015; Yokomi *et al.*, 2018). Las cepas a menudo se encuentran en mezclas dentro de una sola muestra de cítricos (Scott *et al.*, 2013) y pueden producir síntomas variables según los diferentes hospederos y las condiciones ambientales en las que se desarrollan (Harper, 2013).

El virus de la tristeza se transmite fácilmente por injerto al utilizar yemas infectadas y también es dispersado de manera semi-persistente por varias especies de pulgones, entre los que podemos citar a *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) y *Aphis gossypii* (Glover), que poseen la mayor eficiencia de transmisión (Cambra y Moreno, 2000). Ambos vectores están presentes en Argentina, donde consecuentemente la enfermedad es endémica (Figueroa *et al.*, 2009). Argentina es el primer productor e industrializador de limón en el mundo y cerca del 80% del mismo procede de la provincia de Tucumán (FEDERCITRUS, 2018). Diferentes cultivares de limoneros son usados en esta provincia, dentro de los cuales Eureka Frost, Lisboa Frost, Lisboa Limoneira 8A (introducidos desde California) y Génova EEAT (cultivar local seleccionado por la EEAOC) son los más difundidos (Foguet *et al.*, 1987).

Los limoneros (*Citrus limon* (L) Burm f.), cuando son injertados en naranjo agrio (*Citrus x aurantium*, L.) así como en otros portainjertos, tienen un buen desarrollo y aunque se encuentren infectados con CTV las plantas son asintomáticas y el rendimiento y crecimiento no se ven afectados por la enfermedad. Sin embargo, cuando el limonero se injerta en macrophylla (*C. macrophylla* Wester), el portainjerto se ve gravemente afectado manifestando síntomas de acanaladuras o "stem pitting"

en la parte aérea y raíces y detención del crecimiento del árbol, lo que resulta en plantas muy poco productivas (Broadbent *et al.*, 1980; Calavan and Burns, 1968; Piquer *et al.*, 2005).

El objetivo de este estudio fue comparar la composición de genotipos de CTV en diferentes cultivares de limonero injertados en naranjo agrio y en *macrophylla* en un ensayo de campo plantado en la localidad de Famaillá, Tucumán, en diciembre de 2013 y expuesto a una infección natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo a campo se llevó a cabo mediante un diseño aleatorizado en cinco bloques con diez tratamientos, en un marco de plantación de 6 por 8 m. Las plantas fueron producidas en el Centro de Saneamiento de Citrus de la EEAOC y fueron implantadas a campo en el mes de diciembre de 2013 en la localidad de Monte Grande, Tucumán.

Se utilizaron combinaciones de cuatro cultivares de limoneros injertados en naranjo agrio y macrophylla.

Los tratamientos fueron:

- 1- Eureka Frost / macrophylla
- 2- Eureka Frost / Agrio
- 3- Lisboa Frost / macrophylla
- 4- Lisboa Frost / Agrio
- 5- Génova EEAT / macrophylla
- 6- Génova EEAT / Agrio
- 7- Lisboa Limoneira 8 A / macrophylla
- 8- Lisboa Limoneira 8 A / Agrio
- 9- Lisboa Limoneira 8 A / macrophylla *
- 10- Lisboa Limoneira 8 A / Agrio*

Las plantas de los tratamientos 1 a 8 fueron obtenidas a partir de material de propagación saneado por microinjerto de ápices caulinares, libre de CTV, y las plantas de Lisboa Limoneira 8A de los tratamientos 9 y 10 (*) se obtuvieron a partir de yemas de campo infectadas con CTV.

Determinación de dispersión natural y aparición de síntomas

La infección natural de CTV mediada por los pulgones se determinó por el método serológico de inmunopresión-ELISA, en septiembre del 2015, utilizando el kit comercial de Plant Print diagnóstico S.L. (Valencia, España). Se tomaron muestras de brotes tiernos de los cuatro cuadrantes de las plantas del ensayo y el diagnóstico fue ejecutado según el protocolo del fabricante. Simultáneamente se registró la presencia, ausencia y severidad de síntomas de enanismo de la planta y stem pitting del portainjerto mediante observaciones visuales.

Extracción de ácidos nucleicos y detección de genotipos de CTV mediante RT-PCR

Se realizó la extracción de ARN total de dos muestras de cada tratamiento a partir de hojas tiernas expandidas, siguiendo el protocolo de SDS-KOAc con modificaciones, previamente descrito por Garnsey *et al.* (2002).

El diagnóstico por RT-PCR fue llevado a cabo en dos etapas, utilizando cinco juegos de cebadores específicos de genotipos de CTV dentro del marco de lectura abierta 1a de aislamientos de referencia caracterizados: T3, T30, VT, B165 (Roy *et al.*, 2010) y RB (Roy *et al.*, 2013) detallados en la Tabla 1. Las detecciones de cada genotipo se realizaron por separado. La reacción para la síntesis de ADNc consistió en 2 µl del extracto de ARN total, 50 pmol del cebador complementario, 10 U de la Transcriptasa Reversa Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) (Promega, Madison, EEUU), 5 U del Inhibidor de RNasa Ribolock™ (Promega, Madison, EEUU), 1X RT buffer (Promega, Madison, WI, EEUU) y 0,1 mM de mix de dNTP (Promega, Madison, EEUU). Las reacciones se incubaron a 42°C durante 1 h. La fase de PCR se llevó a cabo utilizando 4 µl de ADNc como templado, 2 µM de cebadores homólogo y complementario y 18 µl del GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, EEUU), y agua de grado molecular hasta un volumen total de 50 µl. Las condiciones de ciclado de PCR fueron 1 ciclo de 92°C

durante 2 min, 40 ciclos de 92°C durante 30 s, 55°C durante 45 s, 72°C durante 1 min y un ciclo final de 72°C durante 10 min. Los productos amplificados se visualizaron bajo luz UV mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y tinción con GelRed™ (Biotim, Fremont, CA, EEUU).

Purificación y secuenciación de amplicones

Uno a tres productos de PCR de cada genotipo amplificado fueron purificados desde el gel de agarosa utilizando el kit de Promega, Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). Los productos purificados se enviaron a CERELA (Centro de Referencia para Lactobacilos, San Miguel de Tucumán, Tucumán) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron editadas utilizando el software Chromas Lite 2.1 (Technelysium, Brisbane, Australia). Los alineamientos de secuencias se realizaron usando el software CLUSTAL W alignment (EBI, Cambridgeshire, England) del editor BioEdit Sequence alignment 7.1.3 (Hall 1999), incorporando 69 secuencias de genoma completo de aislamientos de referencia obtenidos de GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

RESULTADOS

La infección natural del virus determinada por inmunoimpresión-ELISA en las 50 plantas del ensayo fue

Tabla 1. Secuencia de cebadores específicos de genotipo utilizados para la amplificación de ARN genómico de aislamientos de CTV mediante RT-PCR

Cebador	Secuencia	Longitud (nt)	Tamaño del producto (pb)
T3-F	GTTATCACGCCTAAAGTTTGGTACCACT	28	409
T3-R	CATGACATCGAAGATAGCCGAAGC	24	
T30-F	TGTTGCGAACTAGTTGACCCTACTG	26	206
T30-R	TAGTGGGCAGAGTGCCAAAAGAGAT	25	
VT-F	TTTGAAAATGGTGATGATTTGCGCGTCA	28	302
VT-R	GACACCGGAAGTGCYTGAACAGAAT	25	
B165-F	GTTAAGAAGGATCACCATCTTGACGTTGA	29	510
B165-R	AAAATGCACTGTAACAAGACCCGACTC	27	
RB-F	AAGYACTTGCACAAGTTGTCACCATCTTA	30	627
RB-R	TGGTCGATTGATACTGTTTCACTAATCCCAT	31	

muy homogénea, independientemente del cultivar, portainjerto o ubicación de la planta dentro del lote. El 100% de las plantas resultaron infectadas dos años después de la plantación, período significativamente menor que el reportado en un ensayo previo realizado en la localidad de las Talitas (Figuroa *et al.*, 2012).

Los limoneros injertados sobre *C. macrophylla* mostraron síntomas evidentes de tristeza, con enanismo y stem pitting del portainjerto en un grado muy severo en la mayoría de las plantas (Figura 1), mientras que los limoneros injertados sobre naranjo agrio, según lo esperado, no manifestaron ningún tipo de síntomas.

En la Tabla 2 se detallan los resultados obtenidos según cultivar y portainjerto para las 20 muestras analizadas por la técnica de RT-PCR utilizando cebadores específicos en reacciones separadas.

Todas las muestras analizadas estuvieron compuestas por una mezcla homogénea de cepas de CTV y no pudo establecerse una correlación entre los síntomas y la composición molecular de los aislamientos. Tampoco hubo diferencia de genotipos de CTV entre las plantas originadas con material infectado y las que se encontraban sanas al momento de la plantación.

Los genotipos T3 y RB fueron detectados en el 100% de las muestras, mientras que T30 estuvo ausente. Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la caracterización previa de la población de CTV en los limoneros de la región NOA (Read *et al.*, 2017). El genotipo VT se encontró en todos los cultivares, en el 85% de las

muestras analizadas. Algunos limoneros injertados en naranjo agrio mostraron una menor concentración del genotipo T3 o ausencia del genotipo VT, ambos considerados severos. Estos últimos estuvieron presentes en todas las muestras analizadas de limoneros injertados en *C. macrophylla*.

Un dato de interés fue que el genotipo B165, previamente reportado en limoneros en Nueva Zelanda (Harper and Pearson, 2015) fue detectado por primera vez en los limoneros en Tucumán en el 85% de las muestras y en todos los cultivares. Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en Nueva Zelanda, en Argentina aún no se detectó el genotipo T30 en esta especie cítrica.

A pesar de que todos los productos de PCR se correspondieron con la longitud esperada para cada genotipo (Figura 2), el análisis de las secuencias mostró en algunos casos una disparidad de alineamiento con el grupo esperado. Los amplicones de RB y VT se agruparon con las secuencias de referencias correspondientes (Figuras 3 y 4), pero un producto de PCR para B165 y uno para T3 no coincidieron con el respectivo grupo. Así, la secuencia de un amplicón de B165 se agrupó dentro de la rama que contiene a la secuencia de referencia asociada a HA 16-5 (Figura 5) y la secuencia de un amplicón de T3 se agrupó con las cepas de referencia para AT-1 (Figura 6).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la composición genotípica de CTV resultante de la infección natural por áfidos es muy homogénea en las plantas de limoneros, sin importar el cultivar o el portainjerto. Con respecto a las cepas identificadas, además de las ya reportadas hasta el momento, esta es la primera vez que se detectó el genotipo B165 en cultivares de limonero en Argentina.

La discrepancia obtenida en la agrupación de algunas secuencias con los genotipos de referencia



Figura 1. Síntomas provocados por infección con CTV. a) Acanaladuras en la madera del portainjerto *C. macrophylla*; b) enanismo de limoneros injertados en *C. macrophylla* (fila de plantas de la derecha). A la izquierda limoneros injertados en naranjo agrio.

Tabla 2. Presencia de genotipos de CTV en las muestras analizadas por la técnica de RT-PCR según cultivar y portainjerto

Cultivar	Portainjerto	Genotipos				
		T3	T30	RB	VT	B165
Lisboa Limoneira 8A*	Agrio	+	-	+	+	+
Lisboa Limoneira 8A*	Agrio	+	-	+	+	+
Lisboa Limoneira 8A*	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	-
Lisboa Limoneira 8A*	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Lisboa Limoneira 8A	Agrio	+	-	+	+	+
Lisboa Limoneira 8A	Agrio	+	-	+	-	-
Lisboa Limoneira 8A	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Lisboa Limoneira 8A	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Eureka Frost	Agrio	+	-	+	+	+
Eureka Frost	Agrio	+	-	+	+	-
Eureka Frost	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Eureka Frost	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Genova EEAT	Agrio	+	-	+	+	+
Genova EEAT	Agrio	+	-	+	+	+
Genova EEAT	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Genova EEAT	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Lisboa Frost	Agrio	+	-	+	-	+
Lisboa Frost	Agrio	+	-	+	-	+
Lisboa Frost	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+
Lisboa Frost	<i>C. macrophylla</i>	+	-	+	+	+

*Plantas infectadas con CTV desde el origen.

podría deberse a que los cebadores utilizados en este trabajo no son los suficientemente específicos para la identificación de la población presente en nuestros aislamientos. En este caso, las tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, o “Next Generation

Sequencing” (NGS), podrían ser una herramienta más adecuada para determinar los genotipos presentes en un aislamiento en particular, especialmente cuando se trata de infecciones mixtas (Read and Pietersen, 2016).

A pesar de la similar composición de genotipos de CTV, la expresión de síntomas en las plantas de limonero injertados sobre *C. macrophylla* y la ausencia de los mismos en plantas injertadas en agrio permiten inferir una marcada sensibilidad de *C. macrophylla* a algunos de los genotipos encontrados en limoneros, los cuales no afectan a naranjo agrio. Futuros estudios de la composición de CTV en estos portainjertos serán útiles para determinar si existe diferencia en la multiplicación de genotipos entre ambos portainjertos.

AGRADECIMIENTOS

Al Pto. Agr. Jose Luis Foguet, por sus valiosos aportes en el diseño y la evaluación de los primeros resultados, y a la empresa SA San Miguel que permitió la realización de este ensayo en su propiedad.

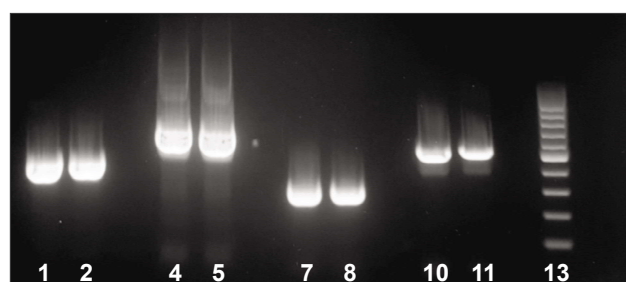


Figura 2. Detección de cuatro genotipos del virus de la tristeza de los cítricos por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa. Calles 1 y 2: amplicones de genotipo T3 (409 pb); calles 4 y 5: amplicones de genotipo RB (627 pb); calles 7 y 8: amplicones de genotipo VT (302 pb); calles 10 y 11: amplicones de genotipo B165 (510 pb); calles 3, 6, 9 y 12: testigos negativos para cada genotipo; calle 13: GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific).

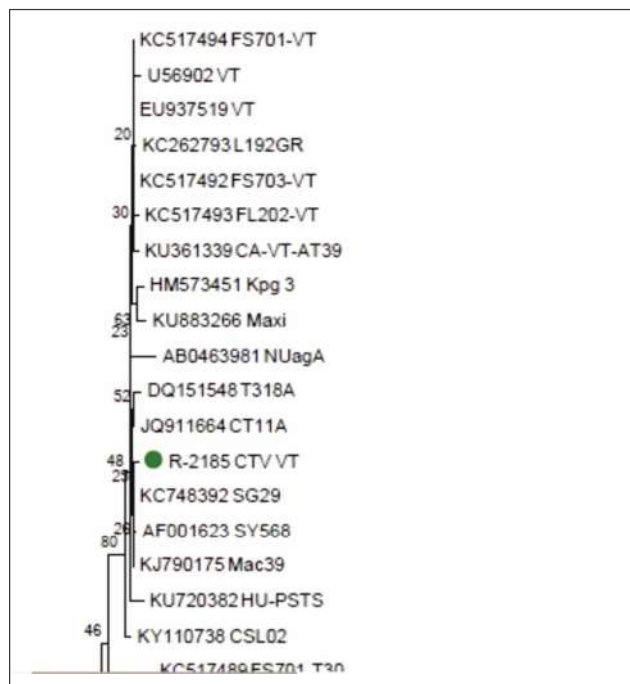


Figura 4. Rama del dendrograma de “Neighbour-joining” producido utilizando el Modelo Compuesto de Máxima Probabilidad (MCL), mostrando las secuencias relacionadas con la secuencia directa del amplicón VT.

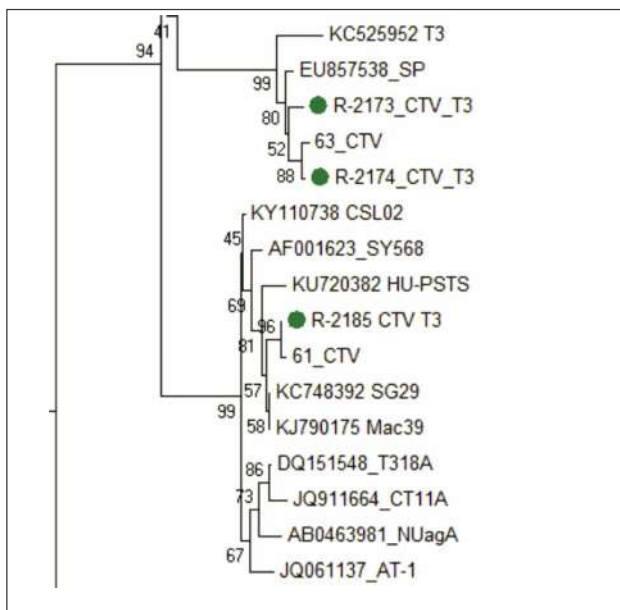


Figura 6. Rama del dendrograma de “Neighbour-joining” producido utilizando el Modelo Compuesto de Máxima Probabilidad (MCL), mostrando las secuencias relacionadas con la secuencia directa del amplicón T3.

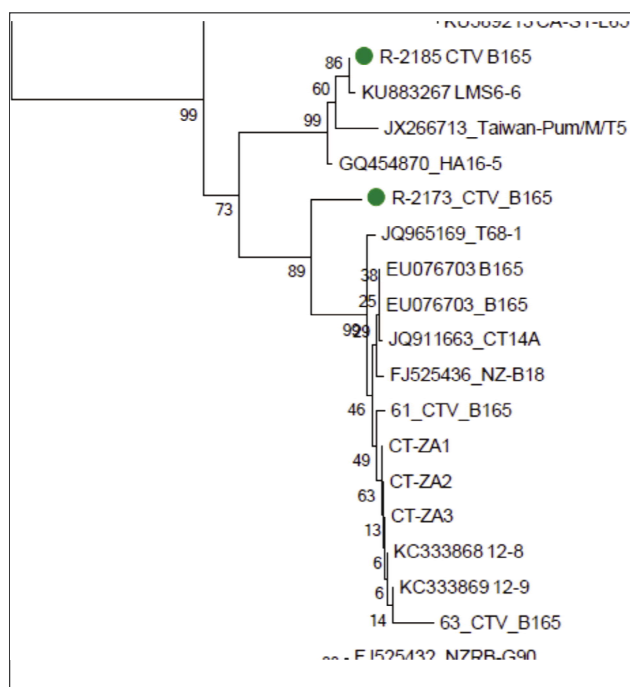


Figura 5. Rama del dendrograma de “Neighbour-joining” producido utilizando el Modelo Compuesto de Máxima Probabilidad (MCL), mostrando las secuencias relacionadas con la secuencia directa del amplicón B165.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bar-Joseph, M.; R. Marcus and R. F. Lee. 1989.** The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annu Rev Phytopathol.* 27: 291–316.
- Broadbent, P.; K. Bevington; L. Fraser and B. Freeman. 1980.** Behavior of *Citrus macrophylla* as a rootstock for Eureka Lemon in trials in New South Wales. *Proc. 8th Conf. IOCV.* [En línea]. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/9x0758j3>.
- Calavan, E. and R. Burns. 1968.** Tristeza in lemon on *Citrus macrophylla* rootstock. *Citrograph.* 53:108-122.
- Cambra, M. y P. Moreno. 2000.** Tristeza. En *Enfermedades de los cítricos. Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología nº 2.* (77-81). Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Coffin, R. and R. Coutts. 1993.** The closteroviruses, capilloviruses and other similar viruses: a short review. *J. Gen. Virol.* 74: 1475-1483.
- Dawson, W. O.; M. Bar-Joseph; S. M. Garnsey and P. Moreno. 2015.** Citrus Tristeza Virus: Making an Ally from an Enemy. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53(1):137-155.
- FEDERCITUS. 2018.** La actividad citrícola argentina. [En línea]. Disponible en: <https://www.federcitrus.org/wp-content/uploads/2018/05/Actividad-Citricola-2018.pdf>.

- Figueroa, J.; L. Foguet; C. Escobar Ponce de Leon; M. F. Palacios; G. Martos and B. Stein. 2012.** Natural spread of Citrus tristeza virus in lemon varieties. *Rev. Ind. Agríc. de Tucumán* 89 (1): 43-46.
- Figueroa, J.; L. Foguet, A. Figueroa Castellanos and B. Stein. 2009.** Biological characterization of Citrus tristeza virus strains in lemon in Tucumán, Argentina. *Rev. Ind. Agríc. de Tucumán* 86 (1): 37-41.
- Foguet, J. L.; J. Gonzalez; H. Vinciguerra y B. Stein. 1987.** Ensayo de portainjertos para limonero Génova EEAT nuc en un suelo de replante. *Rev. Ind. Agric. Tucumán* 64(2): 43-54.
- Garnsey, S. M.; D. L. Zies; M. Irej; P. J. Sieburth; J. S. Semancik; L. Levy and M. E. Hilf. 2002.** Practical Field Detection of Citrus Viroids in Florida by RT-PCR. *Proc. 15th Conf. IOCV.* [En línea]. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/9x08w06f>.
- Hall, T. A. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95-98.
- Harper, S. J. 2013.** Citrus tristeza virus: evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology* 4(93):1-18.
- Harper, S. J. and M. N. Pearson. 2015.** Citrus tristeza virus strains present in New Zealand and the South Pacific. *Journal of Citrus Pathology* 2(1). [En línea]. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/7tf0s6cn>.
- Karasev, A. V. 2000.** Genetic diversity and evolution of closteroviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 38: 293-324.
- Karasev, A. V.; V. Boyko; S. Gowda; O. Nikolaeva; M. Hilf; E. Koonin; C. Nibblet; K. Cline; D. Gumpf; R. Lee; S. Garnsey and W. Dawson. 1995.** Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208:511-520.
- Martín, S.; A. Sambade; L. Rubio; M. C. Vives; P. Moya; J. Guerri; S. F. Elena and P. Moreno. 2009.** Contribution of recombination and selection to molecular evolution of Citrus tristeza virus. *J. Gen. Virol.* 90:1527-1538.
- Piquer, J.; J. Pina; J. Perez-Panades; E. Carbonell; J. Guerra and P. Moreno. 2005.** Preliminary evaluation of the sensitivity of Alemow rootstock to Citrus tristeza virus in Spain. *Proc. 16th Conf. IOCV.* [En línea]. Disponible en: <https://escholarship.org/uc/item/7280j1k5>.
- Read, D. A. and G. Pietersen. 2016.** PCR bias associated with conserved primers designed to determine genotype diversity within citrus tristeza virus populations. *J. Virol. Methods* 237:107-113.
- Read, D. A.; M. F. Palacios; J. Figueroa; L. Foguet; J. Kleynhans; B. Stein and G. Pietersen. 2017.** Survey of citrus tristeza virus (CTV) strains in *Citrus x limon* (L) Burm f. (lemon) in Tucumán Province, Argentina. *Eur J Plant Pathol* 149 (4): 1029-1039. doi:10.1007/s10658-017-1245-2.
- Roy, A.; G. Ananthkrishnan; J. Hartung and R. Brlansky. 2010.** Development and application of a multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assay for screening a global collection of Citrus tristeza virus isolates. *Phytopathol* 100: 1077-1088.
- Roy, A.; N. Choudhary; J. Hartung and R. Brlansky. 2013.** The prevalence of the Citrus tristeza virus trifoliolate resistance breaking genotype among Puerto Rican isolates. *Plant Dis.* 97:1227-1234.
- Scott, K. A.; Q. Hlela; O. Zablocki; D. Read; S. van Vuuren and G. Pietersen. 2013.** Genotype composition of populations of Citrus tristeza virus grapefruit cross-protecting GFMS12 in different host plants and aphid-transmitted sub-isolates. *Arch. Virol.* 158(1): 27-37.
- Yokomi, R.; V. Selvaraj; Y. Maheshwari; M. Chiumenti; M. Saponari; A. Giampetruzzi; Z. Weng; Z. Xiong and S. Hajeri. 2018.** Molecular and biological characterization of a novel mild strain of citrus tristeza virus in California. *Arch. Virol.* 163: 1795.