



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**DETECCIÓN DE TRISTEZA, PSOROSIS, EXOCORTIS,  
CACHEXIA Y ENANISMO EN LIMA PERSA (*Citrus  
latifolia*) EN VERACRUZ, MÉXICO**

Rosalba Contreras Maya

**T E S I S**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

2016

La presente tesis titulada **DETECCIÓN DE TRISTEZA, PSOROSIS, EXOCORTIS, CACHEXIA Y ENANISMO EN LIMA PERSA (*Citrus latifolia*) EN VERACRUZ, MÉXICO** realizada por la alumna: **Rosalba Contreras Maya** con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

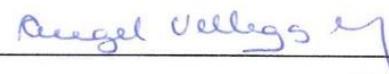
**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

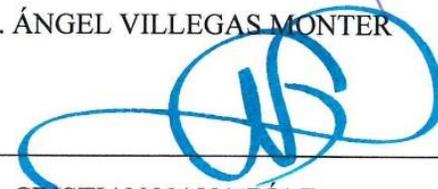
**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO   
\_\_\_\_\_

DR. JOSÉ ANTONIO MORA AGUILERA

ASESOR   
\_\_\_\_\_

DR. ÁNGEL VILLEGAS MONTER

ASESOR   
\_\_\_\_\_

DR. CRISTIAN NAVA DÍAZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre 2016

# DETECCIÓN DE TRISTEZA, PSOROSIS, EXOCORTIS, CACHEXIA Y ENANISMO EN LIMA PERSA (*Citrus latifolia*) EN VERACRUZ, MÉXICO

Rosalba Contreras Maya M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

## RESUMEN

La lima persa (*Citrus latifolia*) es el principal cítrico que exporta México y Veracruz es el principal productor. En las plantaciones se han observado síntomas como; agrietamientos, descortezamiento del tronco y ramas, lo cual conduce al deterioro y bajos rendimientos del cultivo. Sin embargo se desconocen las causas asociadas a los síntomas antes descritos. Por ello se planteó determinar la presencia y distribución de tristeza [*Citrus tristeza virus* (CTV)], psorosis [*Citrus psorosis virus* (CPsV)], exocortis [*Citrus exocortis viroid* (CEVd)], cachexia [*Citrus viroid II* (CVd-II)] y enanismo [*Citrus dwarfing viroid* (CVd-III)] en siete municipios productores y exportadores de lima persa en Veracruz, México. Se realizó extracción de ácidos totales con Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) y de RNA total con TRIzol® Reagent, en la PCR para CTV se usaron los iniciadores CPKF y CPKR. RT-PCR para CPsV el Ps66 y Ps6. En el caso de CEVd el CEVd-h y CEVd-c. Para CVd-II se utilizaron CVd-II-h y CVd-II-c. Por ultimo para CVd-III el CVd-III-h y CVd-III-c. Se detectó a CTV en 12 muestras de las 22 analizadas (54.5%) pertenecientes a los municipios de Martínez de la Torre (MT), Atzalan (AT), Cuitláhuac (CT) y Amatlán de los Reyes (AR). 18 muestras amplificaron para CPsV (81.81%) de MT, AT, SR, CT y AR. Resultaron positivas 20 de las 22 muestras a CEVd (90.9%), de Czones (CZ), SR, MT, Miantla (MS), AT, CT y AR. En el caso de CVd-II 16 muestras de las 22 resultaron positivas (72.7%), el único municipio donde no se detectó fue Miantla. En el caso de CVd-III se tuvo amplificación en 11 muestras (50%) de MT, AT, SR, CT y AR. El exudado gomoso que se genera en las plantas por la infección de *Phytophthora* spp. es el síntoma más notorio para los productores, quienes asocian la muerte de las plantas a dicho oomyceto, sin saber que pueden haber otras causas. Con esta investigación podemos decir que la muerte de las plantas de lima persa en Veracruz se debe a más de un patógeno. Este es el primer reporte de la presencia de CTV, CPsV, CEVd, CVd-II, y CVd-III en lima persa en Veracruz, México.

**Palabras claves:** Cítricos, RT-PCR, Virus, Viroides, Lima persa

# DETECTION OF TRISTEZA, PSOROSIS, EXOCORTIS, CACHEXIA AND ENANISM IN PERSIAN LIMA (*Citrus latifolia*) IN VERACRUZ, MEXICO

Rosalba Contreras Maya M.C.

Colegio de Postgraduados, 2016

## ABSTRACT

Persian lime (*Citrus latifolia*) is the main citrus exported by Mexico and Veracruz is the main producer state. On Persian lime plantations in Veracruz, symptoms such as Cracking, barking of the trunk and branches, which leads to deterioration and low crop yields have been observed. However, the causes associated with the symptoms described above are unknown. The aim goal of this reserch was to determine the presence and distribution of tristeza [*Citrus tristeza virus* (CTV)], psorosis [*Citrus psorose virus* (CPsV)], exocortis [*Citrus exocortis viroid* (CEVd)] and dwarfism [*Citrus dwarfing viroid* (CVd-III)] in seven producing and exporting Persian lime counties in Veracruz, Mexico. Total nucleic acid was obtained with Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen™) and total RNA with TRIzol® Reagent. CPKF and CPKR primers were used in PCR for CTV. RT-PCR for CPsV the Ps66 and Ps6. In the case of CEVd the CEVd-h and CEVd-c. For CVd-II, CVd-II-h and CVd-II-c were used. Finally for CVd-III the CVd-III-h and CVd-III-c. CTV was detected in 12 samples of the 22 analyzed (54.5%) belonging to the counties of Martínez de la Torre (MT), Atzalan (AT), Cuitláhuac (CT) and Amatlán de los Reyes (AR). 18 samples amplified for CPsV (81.81%) of MT, AT, SR, CT and AR. 20 of the 22 samples were positive to CEVd (90.9%), of Cazonas (CZ), SR, MT, Misantla (MS), AT, CT and AR. In the case of CVd-II, 16 samples from 22 were positive (72.7%), the only county where it was not detected was Misantla. In the case of CVd-III amplification was performed in 11 samples (50%) of MT, AT, SR, CT and AR. The gummy exudate that is generated in the plants by the infection of *Phytophthora* spp. is the most notorious symptom for the producers, who associate the death of the plants to said oomycete, without knowing that there may be other causes. With this research we can say that the death of the Persian lime plants in Veracruz is due to more than one pathogen. This is the first report of the presence of CTV, CPsV, CEVd, CVd-II, and CVd-III in Persian lime in Veracruz, Mexico.

**Keywords:** Citrus, RT-PCR, Virus, Viroids, Persian lime

## DEDICATORIAS

A mis padres Isabel Maya Sánchez y Juan Contreras Padilla por haberme formado como la persona que soy; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Con sus buenos ejemplos y sabios consejos me motivan constantemente para alcanzar mis anhelos. He tenido la dicha de tenerlos a ustedes de padres, son las personas más especiales en mi vida, gracias por todo lo que me han dado.

A mis hermanas Leticia, Minerva y Margarita por formar parte de mi motivación.

A Hector por su amor, apoyo, motivación y comprensión.

A la familia Maya por su apoyo y comprensión.

A mis amigos y compañeros: Efrén, Ana, Luvia, Priscila, Johana, Nely, Don Mario, Doña

Ángel, Don Mundo, Adrián y Sandra por todos los momentos que convivimos.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada y al Colegio de Postgraduados por mi formación profesional.

Agradezco a los Dres. Ángel Villegas Monter y Daniel Ochoa Martínez que me han orientado, apoyado y corregido a lo largo de mi formación, con interés y entrega que han sobrepasado todas las expectativas que, como alumna deposite en sus personas.

A los Dres. Antonio Mora y Cristian Nava por su apoyo y orientación.

A los productores de Cazonas, Martínez de la Torre, San Rafael, Misantla, Cañadas, María de la Torre, Atzalan, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes por permitirme el acceso a sus parcelas para la realización del muestreo.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>DEDICATORIAS</b> .....	v
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	vi
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos .....	4
Hipótesis .....	5
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
Aspectos generales .....	6
Tristeza de los cítricos.....	8
<i>Citrus tristeza virus</i> (CTV).....	9
Síntomas .....	9
Tolerancia y susceptibilidad .....	10
Psorosis de los cítricos .....	11
<i>Citrus psorosis virus</i> (CPsV).....	11
Síntomas .....	12
Tolerancia y susceptibilidad .....	13
Viroides .....	13
Exocortis de los cítricos .....	14
<i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd) .....	15
Síntomas .....	15
Tolerancia y susceptibilidad .....	16
Cachexia o xyloporosis. ....	16
<i>Citrus viroid II</i> (CVd-II).....	17
Síntomas .....	18

Tolerancia y susceptibilidad .....	18
Enanismo .....	18
<i>Citrus dwarfing viroid</i> (CVd-III).....	19
Síntomas .....	19
Diagnóstico de virus y viroides.....	20
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
Área y material vegetativo de estudio .....	22
Muestreo y evaluación de incidencia .....	23
Extracción de ácidos nucleicos .....	23
Retrotranscripción-PCR (RT-PCR) .....	24
Electroforesis.....	25
Secuenciación.....	25
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>27</b>
Área y material vegetativo de estudio .....	27
Muestreo y evaluación de incidencia .....	27
Tristeza de los cítricos.....	29
Psorosis.....	34
Exocortis.....	37
Cachexia .....	42
Enanismo .....	45
Resultados generales .....	46
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>51</b>

## LISTA DE CUADROS

**Cuadro 1.** Manejo agronómico y portainjertos utilizados en los huertos muestreados para la detección de Citrus tristeza virus, Citrus psorosis virus, Citrus exocortis viroid, Citrus cachexia viroid y Citrus dwarfing viroid en siete municipios del estado de Veracruz..... 28

**Cuadro 2.** Detección de Citrus tristeza virus (CTV), Citrus psorosis virus (CPsV), Citrus exocortis viroid (CEVd), Citrus cachexia viroid (CVd-II), Citrus dwarfing viroid (CVd-III) en siete municipios exportadores de lima persa (Citrus latifolia) en Veracruz, México. .... 48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Organización genómica de Citrus tristeza virus y proteínas que se generan (Tomado de Tatineni et al., 2011). ..... 9
- Figura 2.** Organización genómica del Citrus psorosis virus. Tomado de Martín et al., 2006). cv: cadena viral complementaria; RdRp: ARN polimerasa-ARN dependiente; p54: proteína de movimiento; CP: proteína de la cápside. .... 12
- Figura 3.** Municipios productores de lima persa del estado de Veracruz donde se realizó el presente estudio.  
Fuente:[http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/div\\_municipal.aspx?tema=me&e=30](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=30) ..... 22
- Figura 4.** Síntomas observados en campo: a) agrietamiento de ramas principales; b) descortezamiento de rama; c) descortezamiento del tronco principal del injerto; d) agrietamiento de rama con exudado gomoso; e) agrietamiento del tronco principal y presencia de goma; f) amarillamiento y muerte de ramas terminales; g) agrietamiento de rama del tercer orden. .... 29
- Figura 5.** Producto de PCR obtenidos con primers específicos para u en las muestras 1-13 (a) y 14-22 (b) que amplifican un fragmento de 273 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua. .... 30
- Figura 6.** Síntomas observados en huertos de Cuitláhuac y Martínez de la torre: a) amarillamiento y muerte de ramas terminales; b) muerte de ramas generalizado; c) muerte de árbol con hojas secas, frutos y frutos amarillos adheridos; d) muerte de ramas terminales y decaimiento del árbol. .... 32
- Figura 7.** Productos de la PCR obtenidos con iniciadores específicos para Citrus psorosis virus en las muestras 1-18 (a) y 19-22 (b) que amplifican un fragmento de 430 pb. P: testigo positivo. M: marcador molecular de 100 pb. N: testigo negativo agua. .... 35
- Figura 8.** Síntomas observados en tronco principal: a, b y c) descortezamiento del tronco de lima persa ..... 36

<b>Figura 9.</b> Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para Citrus exocortis viroid en las muestras 1-13 (a) y 14-22 (b) que amplifican un fragmento de 370 pb. P: testigo positivo; M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.....	38
<b>Figura 10.</b> Síntomas observados en tronco principal del portainjerto e injerto: a) agrietamiento y descortezamiento de ramas principales de L. persa; b) descortezamiento de tronco principal del injerto; c) agrietamiento del portainjerto y cultivar; d) descortezamiento del portainjerto. ....	40
<b>Figura 11.</b> Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para Citrus viroid II que amplifican un fragmento de 300 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua. ....	42
<b>Figura 12.</b> Síntomas observados en ramas: a, b y c) agrietamiento de ramas de segundo, tercer orden y terminales de lima persa. ....	44
<b>Figura 13.</b> Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para Citrus dwarfing viroid en las muestras 1-19 (a) y 20-22 (b) que amplifican un fragmento de 295 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.....	46

## INTRODUCCIÓN

En México, la lima persa (*Citrus latifolia*) es el cítrico que más se exporta como fruto fresco. En 2014, Veracruz fue el principal exportador con 200 000 toneladas equivalentes a \$2400000000.00. Dicha entidad junto con Michoacán y Oaxaca concentran el 79% de la producción anual (SIAP, 2014). Algunas de las enfermedades más comunes en esta especie y otros cítricos a nivel mundial son: tristeza, psorosis, leprosis, exocortis, xyloporosis o cachexia, enanismo, huanglongbing (HLB), Cancro, Clorosis variegada, gomosis, antracnosis, además de otras alteraciones de origen desconocido hasta la fecha como blight y wood pocket.

En nuestro país la mayoría de las plantaciones de lima persa tienen una vida productiva de poco más de cinco años ya que después de este tiempo muchos árboles mueren. Las plantas muertas son cortadas dejando un tocón de 10 cm y sustituidas por nuevas plantas establecidas a 20 cm de la que fue eliminada. Los productores atribuyen la muerte de los árboles a *Phytophthora* spp., debido a que observan “goma” en el tronco de las plantas afectadas. Se ha fundamentado en la literatura que para que este oomiceto pueda penetrar necesita una herida en la planta, que en el caso de lima persa, puede ser ocasionada por psorosis, exocortis y/o cachexia, enfermedades que hasta hoy han sido ignoradas.

La tristeza es causada por el *Citrus tristeza virus* (CTV) de la familia *Closteroviridae*, género *Closterovirus*, es el agente causal de una de las enfermedades de mayor importancia en cítricos. El daño severo se presenta en árboles de naranja, pomelo y mandarina injertados en

naranja agrio (*Citrus aurantium*), así como en árboles de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) independiente del portainjerto utilizado (Iracheta *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 1995).

La mayoría de las especies de cítricos son huéspedes asintomáticos para muchos aislamientos de CTV; Sin embargo, se puede atribuir varios síntomas a la infección por CTV, dependiendo de la combinación injerto-portainjerto y de la cepa del virus. Los síntomas característicos son: declinamiento rápido que conduce a la muerte de la planta en pocas semanas; reducción del rendimiento y la calidad de la fruta de algunas variedades de *Citrus* y amarillamiento generalizado como se ha observado en *Citrus limon* y *Citrus paradisi* (Laino *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2008).

La psorosis es causada por *Citrus psorosis virus* (CPsV) del género *Ophiovirus* (Martí *et al.*, 2004). Fue la primera enfermedad viral de los cítricos transmitida por injerto (Fawcett, 1938; citado por Roistacher, 2004)). Debido a esta enfermedad se generó un programa de erradicación y se desarrolló un método de indexado biológico para su detección (Roistacher, 2004). El CPsV posee viriones filamentos flexibles de 3-4 nm de diámetro (García *et al.*, 1994). Su genoma está constituido por tres ARNs monocatenarios de polaridad positiva cubiertos cada uno de ellos por una cubierta proteínica (CP) de 48 kDa (Barthe *et al.*, 1998; García *et al.*, 1997). La psorosis se caracteriza por ocasionar síntomas después de 10 años de ocurrida la infección consistentes en descamación de la corteza del tronco y ramas principales de árboles adultos así como declinamiento y reducción del rendimiento (Achachi *et al.*, 2014). En hojas jóvenes y frutos puede producirse clorosis, moteado o manchas anulares (Martí *et al.*, 2004). En naranja dulce, mandarina y pomelo se observa descamación y manchas cloróticas en hojas jóvenes, mientras que el naranja agrio se tiene solamente moteado.

La exocortis es causada por *Citrus exocortis viroid* (CEVd), fue el primer viroide caracterizado de cítricos asociado a la descamación de la corteza en *Poncirus trifoliata* (Fawcett y Klotz, 1948). Se trata de una molécula de ARN monocatenario de 365 a 475 nucleótidos (nt) de longitud, pertenece al género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae* (Lin *et al.*, 2015). En *P. trifoliata* ocasiona descortezamiento, rajaduras del tronco y ramas principales, epinastia y reducción del crecimiento (Barkley, 2008; Elleuch *et al.*, 2003). En materiales injertados sobre naranjo agrio no se observan síntomas; mientras que, los portainjertos trifoliados, citrangeres Troyer y Carrizo, lima Rangpur, lima dulce y cidra son susceptibles a este viroide (Vernière *et al.*, 2004; 2005).

La Cachexia (también conocida como xyloporosis-CVd-II) fue descrita por primera vez en 1950 en tangelo Orlando ocasionando oscurecimiento de los tejidos del floema y picado de tallo (Childs, 1950). El agente causal de esta enfermedad fue identificado y caracterizado como una variante del *Hop stunt viroid* (HSVd) denominado CVd II (*Citrus viroid II*) (Reanwarakorn y Semancik 1999), molécula de ARN monocatenario de 295-303 nt de longitud y es la única especie del género *Hostuviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae* (Flores *et al.*, 2005). Los síntomas típicos de esta enfermedad en diversos cítricos consisten en decoloración y picado de tallo (Amine *et al.*, 2006) aunque en algunos casos se observan también hojas pequeñas de color amarillo, así como el agrietamiento de la corteza de ramas las cuales con el tiempo se marchitan y mueren (Bar 2015). Esta enfermedad afecta a mandarina (*Citrus reticulata*), clementinas (*C. clementina*), satsumas y lima rangpur (Serra *et al.*, 2008).

En Veracruz se han observan plantaciones de lima persa con agrietamientos de la corteza, descamación, amarillamiento, decaimiento (e incluso muerte), lo cual conduce al deterioro y disminución del rendimiento. Estos síntomas se presentan en el tronco y ramas de injertos y

portainjertos a excepción de naranjo agrio que es tolerante a varias enfermedades. Los productores han asociado la muerte de los árboles a *Phytophthora* spp., debido a la presencia de un exudado gomoso en las plantas afectadas. Sin embargo se desconoce si también existen virus o viroides asociados a los síntomas antes descritos. Es por ello que se planteó la siguiente investigación para determinar si en las plantaciones de lima persa se encuentran presentes *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus viroid II* (CVd-II) y *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III).

### **Objetivo general**

Conocer la presencia y distribución de CTV, CPsV, CEVd, CVd-II y CVd-III en siete municipios productores y exportadores de lima persa en Veracruz, México.

### **Objetivos específicos**

Determinar protocolos para la detección de virus (CTV, CPsV) y viroides (CEVd, CVd-II y CVd-III).

Evaluar la incidencia de síntomas asociados a los virus (CTV, CPsV) y viroides (CEVd, CVd-II y CVd-III).

Identificar los síntomas asociados a los virus y viroides en cada huerta de acuerdo al grado de tecnología utilizado.

## **Hipótesis**

En las plantaciones de Lima persa de los Municipios de Cazonas, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Misantla, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes, existe al menos un virus y un viroide.

La incidencia de síntomas depende del grado de tecnología utilizada en cada huerto.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Aspectos generales

En la literatura *Citrus latifolia* ha sido denominada por diferentes autores como lima persa, lima Tahití, lima, limón persa, limón sin semilla o simplemente lima. Con el propósito de evitar confusión, en el presente escrito se empleará el nombre común de lima persa para referirse a esta especie.

De acuerdo con los reportes del Sistema de Información Agroalimentaria de Consulta cuatro estados concentran la producción de lima persa, Veracruz (621,848 t), Oaxaca (136,859.93 t), Tabasco (82,595.5 t) y Jalisco (63,543.87 t) (SIACON, 2014).

El gobierno federal a través de la Dirección General de Sanidad Vegetal establece el marco legal y las prácticas apropiadas para la protección de los cultivos y sus productos contra los daños ocasionados por las plagas. También se pretende mantener a los organismos nocivos en niveles de población económicamente aceptable (en caso de que ya estén establecidos) y prevenir la introducción y extensión de aquellos organismos no establecidos. En el caso particular de los cítricos, en 2001 entra en vigor la Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos y en 2002 la NOM-079-FITO-2002 que establece los requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos. Ambas normas para el estado de Veracruz, han sido fundamentales para comercializar los cítricos en mercados nacionales y extranjeros.

En la actualidad en México se han establecido medidas legales para la enfermedad Huanglongbing (HLB) de los cítricos ocasionada por *Candidatus Liberibacter* spp., que a nivel internacional ha sido destructiva y para la cual no existe control. Los árboles afectados por HLB producen frutos de baja calidad y con el tiempo mueren. Particularmente, el HLB ya ha afectado gravemente la producción citrícola de Brasil y Florida (Ángel *et al.*, 2014).

Por otra parte, la enfermedad conocida como tristeza de los cítricos es provocada por un virus que puede causar amarillamiento, declinamiento y producción de frutos pequeños. Este virus ha provocado grandes epidemias en algunos países donde se ha presentado. En México, hasta 2007, la Campaña contra esta enfermedad realizó acciones para la detección y eliminación de árboles positivos mediante análisis serológicos. Sin embargo, las variantes del virus presente en México han sido consideradas “débiles” ya que no han ocasionado los daños que se han observado en otros países, razón por la cual se determinó no continuar con la eliminación de plantas positivas.

Además de las enfermedades antes mencionadas, los cítricos son afectados por otros patógenos que pueden afectar a la semilla desde que está dentro del fruto, a la plántula o al árbol ya establecido en órganos como raíz, tronco, ramas, hojas, flores y frutos. Entre estos patógenos se encuentran fitoplasmas, espiroplamas, bacterias, hongos, oomycetos, algas, nematodos, virus y viroides (Almeyda *et al.*, 2003) como *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus leprosis virus* (CiLV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus viroid II* (CVd-II), *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III), además otras enfermedades de etiología desconocida como blight y wood pocket.

## **Tristeza de los cítricos**

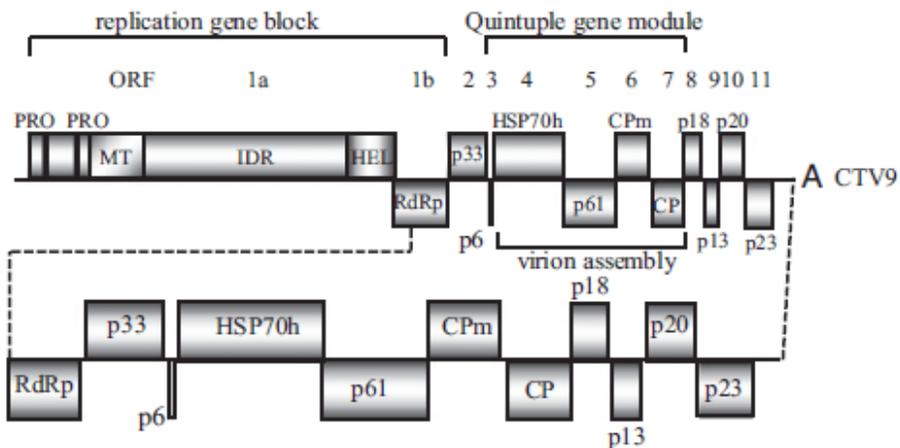
Esta enfermedad fue detectada en 1934 en Brasil causando la muerte de 100 millones de árboles y en 1939 fue observada en California, Estados Unidos de Norteamérica donde fue denominada “quick decline” (QD). Los estudios realizados por Halma y Smoyer en 1944 indicaron que QD era similar a la “tristeza” reportada en Brasil (Fawcett y Wallace 1946). En 1946 Meneghini reporta que la tristeza en Brasil era causada por un virus y que la variante severa ocasionó la muerte de al menos tres millones de árboles en California. En Florida, Grant y Schneider (1951) reportaron por primera vez la presencia de la tristeza de los cítricos, aunque sin duda existió muchos años antes de su registro (Bar-joseph *et al.*, 1989).

La tristeza de los cítricos es causada por *Citrus tristeza virus* (CTV) considerado el virus más dañino de los cítricos. En Argentina, durante su aparición en 1945, provocó la muerte de aproximadamente 10 millones de árboles y para 1959 esta cifra aumentó a 18 millones. En Brasil se reportaron más de 10 millones de árboles perdidos en 1958. En España, durante la década de 1960 y en Venezuela en 1980 murieron 16 millones de árboles (Rocha *et al.*, 1995).

En México, el CTV se detectó por primera vez en 1983 en el estado de Tamaulipas y en 1986 en Veracruz; ambos brotes fueron eliminados oportunamente. Sin embargo, posteriormente el virus fue reportado en otros estados de la República mexicana [http://www.nappo.org/files/6214/3744/6322/2\\_B\\_Luis\\_Angel\\_Villareal\\_y\\_Robert\\_Krueger\\_Historia\\_y\\_Situacion\\_de\\_VTC\\_en\\_Mexico.pdf](http://www.nappo.org/files/6214/3744/6322/2_B_Luis_Angel_Villareal_y_Robert_Krueger_Historia_y_Situacion_de_VTC_en_Mexico.pdf).

## *Citrus tristeza virus* (CTV)

El CTV pertenece al género *Closterovirus*, familia *Closteroviridae*, es un virus con partículas filamentosas de 2000 nm de longitud x 11 nm de diámetro. El genoma consiste en una molécula de ARN de sentido positivo con 12 marcos de lectura abierta (Open Reading Frame, ORF's) que codifican hasta 19 proteínas (Figura 1). En extremo 5' está la información para codificar las proteínas requeridas en su replicación (RNA polimerasa -RNA dependiente, helicasa, metiltransferasa y proteasas) (Satyanarayana *et al.*, 1999); mientras que en el extremo 3' se tienen las regiones que codifican las proteínas involucradas en la interacción del virus con su hospedante (Lu *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Organización genómica de *Citrus tristeza virus* y proteínas que se generan (Tomado de Tatineni *et al.*, 2011).

## Síntomas

Los síntomas principales que causa el CTV son decadencia y muerte de las plantas injertadas en naranjo agrio (*Citrus aurantium*), retraso del crecimiento y coloración amarillenta de

plántulas de pomelo (*C. paradisi*), picado de tallo que provoca bajos rendimientos de los diferentes cultivares y aclaramiento de nervaduras (Moreno *et al.*, 2008; Varveri *et al.*, 2015).

Los cultivos afectados y la intensidad de los síntomas dependen de la combinación portainjerto-cultivar y del aislamiento viral; existen aislamientos débiles asociados al declinamiento de árboles debido a la necrosis del floema, lo cual puede reducirse utilizando portainjertos tolerantes, los cuales, sin embargo, pueden ser susceptibles a otras enfermedades (Moreno *et al.* 2008). Por otra parte, aislamientos severos inducen picado del tallo y pueden reducir el vigor y la producción del injerto, independientemente del portainjerto (Garnsey *et al.*, 1979; Rocha *et al.*, 1995)

### **Tolerancia y susceptibilidad**

Los siguientes portainjertos se consideran tolerantes a CTV; limón cravo (*C. limonia*), cleopatra (*C. reshni*), citrumelo swingle (*C. paradisi* × *P. trifoliata*), Troyer, Carrizo, Cleopatra, limón rugoso, *Citrus volkameriana*, y *Poncirus trifoliata* son tolerantes a algunas cepas de CTV (Bar-joseph *et al.*, 1989; Garnsey *et al.*, 1979; Laino *et al.*, 2016).

Naranja dulce (*C. sinensis*), mandarina (*C. reticulata*), pomelo (*C. paradisi*), Limón mexicano (*C. aurantifolia*), Limón (*C. limon*) y lima persa (*C. latifolia*) son susceptibles a este virus (Moreno *et al.*, 2008).

## **Psorosis de los cítricos**

La psorosis fue una de las primeras enfermedades virales estudiadas en los cítricos. Se describió en Florida, USA, por Swingle y Webber, (1896) sin conocer su etiología viral. Una enfermedad similar fue identificada en California por Smith y Butler en 1908, a la que nombraron descamamiento de la corteza (scaly bark), la cual parecía ser idéntica a la descrita en Florida basada en la similitud de los síntomas y los efectos a largo plazo en los cítricos. En 1933, se estableció la etiología viral de esta enfermedad a la cual se denominó psorosis. Fawcett observó mosaico en hojas jóvenes de los árboles afectados y estableció su asociación con las lesiones en la corteza por lo cual sugirió que la enfermedad era causada por un virus (Roistacher, 1993; FAO, 2016).

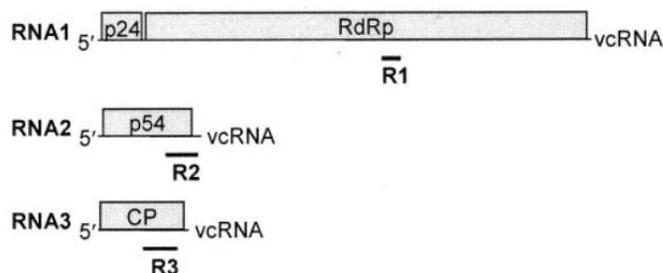
En un tiempo, la psorosis fue la enfermedad más destructiva de los cítricos y, actualmente, sigue siendo de importancia económica en algunos lugares. Se encuentra distribuida por todo el mundo causando disminución del vigor, producción y reducción de la vida útil de los árboles (Roistacher, 1993; Martelli y D' Onghia, 1998; D'Onghia *et al.*, 2001).

Es una enfermedad de avance lento con periodo de incubación de 10 a 20 años en algunas ocasiones. Todas las especies de cítricos son susceptibles y está presente en todas las áreas cítricas de México (Iracheta *et al.*, 2004).

### ***Citrus psorosis virus (CPsV)***

La psorosis es causada por el CPsV del género *Ophiovirus* (Martí *et al.*, 2004). Este virus posee viriones filamentosos de 3-4 nm de diámetro. Se compone de tres ARN (de cadena simple) de polaridad negativa y una proteína de la cubierta (CP) de 48 kDa (Figura 2) (Barthe *et al.*, 1998;

García *et al.*, 1997; Sánchez de la Torre *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2006). El ARN-1 tiene 8184 nucleótidos (nt) y la cadena complementaria contiene dos ORFs que codifican una proteína de 24 kDa de función desconocida y un ARN polimerasa, ARN dependiente (Naum *et al.*, 2003; Vaira *et al.*, 2012). El ARN-2 tiene aproximadamente 1644 nt y codifica una proteína de movimiento de 54 kDa (Sánchez de la Torre *et al.*, 2002; Robles *et al.*, 2013); finalmente, el ARN-3, de 1454 nt de longitud, codifica la cubierta proteica (Sánchez de la Torre *et al.*, 2002; Vaira *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Organización genómica del *Citrus psorosis virus*. Tomado de Martín *et al.*, 2006). cv: cadena viral complementaria; RdRp: ARN polimerasa-ARN dependiente; p54: proteína de movimiento; CP: proteína de la cápside.

## Síntomas

Esta enfermedad ha sido reportada en varias áreas cítricas del mundo (Roistacher 1933), sin causar la muerte de los árboles pero sí disminuyendo la producción (Achachi *et al.*, 2014). La psorosis se caracteriza por la descamación de la corteza del tronco y las ramas principales de los árboles adultos, declinamiento y reducción del rendimiento. Se transmite fácilmente por injerto y los síntomas aparecen raramente antes de los 10 años (Roistacher 1933; Achachi *et al.*, 2014). En hojas jóvenes puede observarse moteado o clorosis y en algunas ocasiones manchas anulares tanto en hojas como en frutos (Martí *et al.*, 2004)

Como se ha mencionado, el virus es transmitido por injerto, en consecuencia los productores a menudo propagan plantas usando brotes infectados procedentes de árboles asintomáticos, lo que explica en parte la alta incidencia de psorosis en algunas zonas productoras (Martin *et al.*, 2002).

El progreso de la infección y la aparición de síntomas son lentos, por lo que después de varios años provoca la obstrucción de los haces vasculares, decadencia general y en casos extremos la muerte de los árboles. Este hecho subraya la necesidad de un método rápido de diagnóstico, antes de que la enfermedad haya progresado (De Francesco *et al.*, 2015).

### **Tolerancia y susceptibilidad**

Las especies susceptibles a psorosis son mandarina (*C. reticulata*), naranja navelina (*C. sinensis*), tangor Dweet (*C. sinensis* x *C. reticulata*) y pomelo (*C. paradisi*) (D'Onghia *et al.*, 2001), mientras que, el naranjo agrio (*C. aurantium*), limón mexicano (*C. aurantifolia*) y limón rugoso (*C. jambhiri*) son tolerantes (Iracheta *et al.*, 2004).

### **Viroides**

Los viroides son agentes infecciosos de ARN monocatenario que no codifican proteínas por lo que dependen de las enzimas del hospedante para su replicación. Se clasifican en dos familias con base en sus propiedades biológicas y físicas. En cítricos se han reportado los siguientes: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III), *Citrus bark cracking viroid* (CVd-IV) y *Citrus viroide*

OS (CVd-OS) (Ito, *et al.*, 2001), los cuales tienen genomas pequeños que van desde 284 a 375 nucleótidos (Duran-Vila *et al.*, 1988). Y causan enfermedades de importancia económica: exocortis (CEVd) y cachexia (CVd-II). La replicación del viroide ocurre en compartimentos subcelulares específicos y se encuentra en toda la planta, lo que conlleva una infección sistémica (Lin *et al.*, 2015).

### **Exocortis de los cítricos**

El término exocortis fue propuesto por Fawcett y Klots (1948) al observar retraso en crecimiento y descamación de la corteza en naranjo trifoliado, en ese entonces no se conocía la naturaleza o causa de la exocortis y se atribuyó a un factor genético o virus que solo se presentaba en plantas trifoliadas a partir del injerto (Fawcett y Klotz 1948; Nauer *et al.*, 1977).

Exocortis es una enfermedad distribuida en todo el mundo asociada al CEVd o a un complejo de viroides como *Hop stunt viroid* (HSVd) o su variante conocido como *Citrus viroid II* (CVd-II), *Citrus bent leaf viroid* o *Citrus viroid I* (CVd-I), *Citrus viroid III* (CVd-III) y *Citrus viroid IV* (CVd-IV) (Duran-Vila *et al.*, 1988). Las plantas susceptibles muestran descamación de la corteza del portainjerto y retraso en el crecimiento (Elleuch *et al.*, 2003).

En México, es común la ocurrencia de viroides en la mayoría de las plantaciones de naranja (*Citrus sinensis*), pomelo (*C. paradisi*) y mandarina (*C. reticulata*) (Almeyda *et al.*, 2003). En las plantaciones de lima Persa (*Citrus latifolia*) de México, es frecuente observar síntomas de agrietamientos longitudinales en ramas y troncos de los árboles, los cuales han sido asociados a la

presencia de CEVd y viroides de los grupos II (CVd-II) y III (CVd-III) de los cítricos (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002).

Estos viroides son transportados en la savia de la planta y se pueden transmitir de un árbol a otro por injerto y herramientas no desinfectadas, o bien, por injerto natural de raíces; se desconoce su transmisión por insectos chupadores de savia o por semilla (Barkley 2008).

### ***Citrus exocortis viroid (CEVd)***

CEVd es el más grande de los viroides con 371 a 475 nt y pertenece al género *Pospiviroid* de la familia *Pospiviroidae* (Palacio *et al.*, 1999; Szychowski *et al.*, 2005; Hajeri *et al.*, 2011).

### **Síntomas**

*Citrus exocortis viroide* puede infectar a todas las variedades de cítricos y la mayoría son asintomáticos. Sin embargo, cuando se observan síntomas, estos se desarrollan cuando las varetas provienen de plantas infectadas y se injertan en portainjertos susceptibles como *Poncirus trifoliata*, lima Rangpur, y a veces Swingle. Los árboles injertados en *P. trifoliata* son los más susceptibles, presentan descamación de la corteza y retraso del crecimiento, principalmente cuando los árboles tienen aproximadamente 4 años. Al inicio aparecen agrietamientos y después desprendimiento de la corteza debajo del sitio de unión portainjerto-injerto (Barkley 2008).

El CEVd provoca disminución en la cantidad de arginina, aumento de lisina y en algunos casos se observa acumulación de goma en la porción inferior al punto de unión portainjerto-injerto.

En plantas sanas se tienen mayores concentraciones de ácido málico y menores de ácido cítrico que en las enfermas (Palacio *et al.*, 1999; Uc *et al.*, 2005).

La exocortis no tiene efecto en la calidad del fruto pero reduce el rendimiento del árbol, el tipo y gravedad de los síntomas dependen del portainjerto, cultivar y presencia de otros viroides. Las altas temperaturas también pueden acelerar el desarrollo de los síntomas (Barkley 2008).

### **Tolerancia y susceptibilidad**

Los híbridos de citrange Troyer y Carrizo (*Citrus sinensis* × *P. trifoliata*), lima Rangpur (*C. limonia*), utilizados como portainjertos, son susceptibles a exocortis (Barbosa *et al.*, 2005). Cuando los cultivares tolerantes son injertadas sobre portainjertos sensibles, la descamación de la corteza se puede observar en el tronco, mientras la copa del árbol se torna de color amarillento y hay reducción de tamaño (Eiras *et al.*, 2013).

### **Cachexia o xyloporosis.**

Reichert y Perlberger (1934) informaron sobre una nueva enfermedad a la que denominaron xyloporosis, que apareció en 1928, en plantaciones de naranjo dulce Shamouti injertados en lima dulce Palestinian (PSL), portainjerto usado en el área Británica de Palestina. Estos autores describieron tres fases esenciales del desarrollo de xyloporosis: a) pequeñas depresiones en la corteza del portainjerto y pequeñas picaduras de color marrón en la parte interior de la corteza. Estos síntomas aparecen al año de realizar el injerto y son más notables cerca de la

unión. b) la madera se decolora, las ramas del árbol se doblan y sus hojas se tornan de color amarillo. c) Se forman rajaduras en la corteza y ésta se vuelve de color negro mientras que las hojas son pequeñas y de color amarillo. Con el tiempo, las ramas se marchitan y mueren (Bar 2015).

Childs (1950) al hacer transmisión por injerto de una enfermedad en mandarinas denominada cachexia observó los síntomas antes descritos para xyloporosis. Estos resultados sugirieron que xyloporosis y cachexia eran la misma enfermedad, y con base en la convención de dar prioridad a los nombres científicos, se propuso el uso de caquexia para nombrar a esta enfermedad (Serra *et al.*, 2008). En el resto del texto de este documento se empleará el término cachexia.

Norman y Childs (1963) trataron de transmitir la cachexia con cinco especies de insectos sin lograrlo y Olson (1965) demostró que esta enfermedad no se transmite por semilla. Bar-Joseph (2003) por su parte, demostró que cachexia es causada por variantes de HSVd (*Hop stunt viroid*) (Eiras *et al.*, 2013), específicamente *Citrus viroid II* (CVd-II).

### ***Citrus viroid II* (CVd-II)**

Los genomas de los viroides del grupo CVd-II (CVd-IIa, CVd-IIb y CVd-IIc) están conformados de 284 a 375 nucleótidos y son considerados como variantes del HSVd causantes de la cachexia (Reanwarakorn *et al.*, 1999; Semancik *et al.*, 1992). *Citrus viroid-IIa* tiene 302 nt e induce leves grietas en la corteza de naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) mientras que CVd-IIb posee 298 ó 299 nt y CVd-IIc de 295 a 296 nt (Ónelge *et al.*, 2004; Vidalakis *et al.*, 2005).

## **Síntomas**

Los cítricos afectados por cachexia muestran decoloración del floema, picado del tallo, rajaduras y descortezamiento de ramas, enanismo, clorosis y declinamiento que conlleva a la muerte. Esta enfermedad afecta mandarina (*Citrus reticulata*), clementina (*C. clementina*), satsuma (*C. unshiu*) así como tangelo (*C. paradisi* x *C. reticulata*) (Serra *et al.*, 2008).

## **Tolerancia y susceptibilidad**

Los híbridos de mandarina (tangors y tangelos), mandarina (*C. reticulata*), satsuma (*C. unshiu*) *Fortunella* spp., *C. clementina*, *C. macrophylla*, lima Rangpur (*C. limonia*) y *Poncirus trifoliata* son susceptibles (Barbosa *et al.*, 2005; Eiras *et al.*, 2013).

## **Enanismo**

Como se indicó previamente, CEVd y CVdII son los agentes causales de exocortis y cachexia, respectivamente. Ambos viroides tienen varios hospedantes entre las plantas rutáceas y no rutáceas. En contraste, *Citrus viroid* III (CVd-III) solo se ha encontrado en plantas del género *Citrus* de forma asintomática (Barbosa *et al.*, 2005). No obstante, se ha observado enanismo en plantas de cítricos injertadas en naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*) y sus híbridos, así como en lima Rangpur (*C. limonia*) donde además reduce el dosel del árbol pero no afecta el rendimiento ni la calidad de los frutos (Hutton 2000; Vernière *et al.*, 2004).

En 2010 el Departamento de Agricultura y Alimentación de California (CDFA) aprobó el uso comercial de una variante de este viroide denominado TsnRNA-IIIb (syn. *Citrus dwarfing viroid-IIIb* con fines comerciales (Vernière *et al.*, 2004; Vidalakis *et al.*, 2011). Esta variante reduce el volumen del árbol, aumenta el tamaño del fruto y rendimiento de naranja dulce (*Citrus sinensis*) injertado en *Poncirus trifoliata* sin causar alguna alteración que pudiera perjudicar la producción (Tessitori *et al.*, 2002; Vernière *et al.*, 2004).

### ***Citrus dwarfing viroid (CVd-III)***

La primera descripción de este viroide data de 1988, cuando se identificaron otros ARNs que migraban de manera diferente a las conocidas en otros casos (CVd-IIIa, CVd-IIIb, CVd-IIIc y CVd-IIId) y su tamaño se estimó en un intervalo de 280 a 292 nt (Duran-Vila *et al.*, 1988). La secuenciación de estas bandas demostró que se trataba de variantes de un mismo viroide (CVd-III), con elevada identidad de secuencia entre ellos (Rakowski *et al.*, 1994). El CVd-III ha sido recientemente nombrado como *Citrus dwarfing viroid* (CDVd) y se ubicó en el género *Apscaviroid* dentro de la familia *Pospiviroidae* (Murcia *et al.*, 2009; Nubia *et al.*, 2011).

### **Síntomas**

Vernière *et al.*, (2004) mencionan que el único efecto visible de CDVd es el enanismo en árboles infectados por lo que podría ser un agente de interés comercial para reducir el tamaño de cítricos sin inducir otro efecto indeseable. En arboles de clementina injertados en *Poncirus trifoliata*, no se observaron interacciones antagónicas entre CEVd-CDVd o CBLVd-CVd-III

(Vernière *et al.*, 2005). Asimismo el CDVd solo o en combinación con variantes de *Hop stunt viroid* que inducen cachexia también es capaz de reducir el tamaño del árbol (Hutton 2000).

## **Diagnóstico de virus y viroides**

En la actualidad existen varios métodos disponibles para detección de virus y viroides en cítricos. Algunos de los más comunes son.

**Indexación biológica.** consiste en el injerto de materiales sospechosos en plantas indicadoras de cítricos (Martí *et al.*, 2004; Achachi *et al.*, 2014). Este procedimiento tiene la desventaja de ser lento y costoso, además de requiere instalaciones adecuadas, personal capacitado y no puede ser utilizada a gran escala (Martí *et al.*, 2004).

**DAS-ELISA** (García *et al.*, 1997) y **TAS-ELISA** (Alioto *et al.*, 1999) son los métodos desarrollados y aplicados en un gran número de estudios en campo. Los antisueros producidos contra la cápside viral son de uso generalizado en los kits estandarizados que se venden comercialmente (Loconsole *et al.*, 2006). Sin embargo, a veces es difícil utilizar estas técnicas para detectar ciertos virus en cítricos debido a la distribución heterogénea en árboles infectados. Las propiedades antigénicas de los virus a detectar y las variaciones en la sensibilidad/precisión de las pruebas también limitan el uso de estas pruebas serológicas además de que no son aplicables en el caso de viroides (Rosa *et al.*, 2007).

Esfuerzos considerables se han realizado durante los últimos 10 años para desarrollar y aplicar métodos moleculares más fiables, menos costosos y más sensibles basados en la reacción

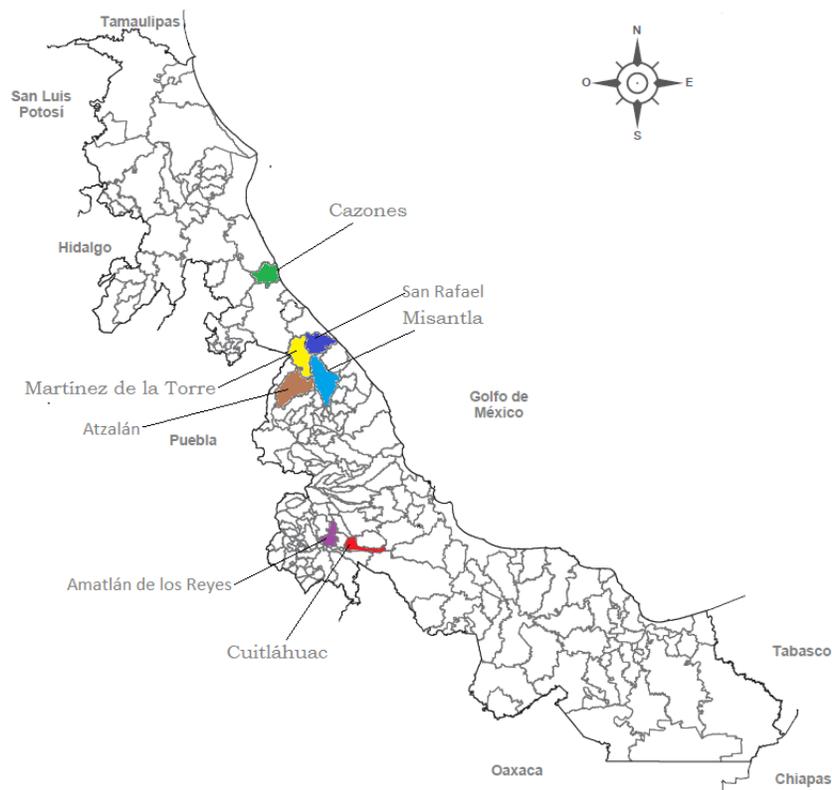
en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) e hibridación (Albiach, 2012; Barthe *et al.*, 1998; De Francesco *et al.*, 2015; Loconsole *et al.*, 2009; Rosa *et al.*, 2007). Considerando la alta frecuencia de árboles infectados con un complejo viral o viroidal recientemente se ha establecido la RT-PCR dúplex y múltiplex en un solo paso y la RT-PCR en tiempo real (Giuliana *et al.*, 2010).

La RT-PCR es un método rápido y fiable para la detección de virus y viroides de plantas infectadas. Actualmente, la RT-PCR es la técnica más sensible para conocer la presencia o ausencia de ARN específico (Ragozzino *et al.*, 2004).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área y material vegetativo de estudio

El estudio se realizó en huertos comerciales ubicados en los municipios de Cazonos, San Rafael, Misantla, Martínez de la Torre, Atzalán, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes, Veracruz, que son los principales exportadores de lima persa en México (Figura 3).



**Figura 3.** Municipios productores de lima persa del estado de Veracruz donde se realizó el presente estudio.

Fuente: [http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/div\\_municipal.aspx?tema=me&e=30](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/ver/territorio/div_municipal.aspx?tema=me&e=30)

## **Muestreo y evaluación de incidencia**

En cada huerto se eligieron al azar 20 árboles distribuidos en un bloque de aproximadamente 24 x 30 m para evaluar el porcentaje de plantas con síntomas asociados a tristeza, psorosis, exocortis, cachexia y enanismo. Posteriormente, en cada bloque se seleccionaron cinco árboles, con disposición en cinco de oros, de los cuales se colectaron cuatro brotes en crecimiento activo (un brote por orientación cardinal) de la estación de crecimiento de verano (junio-agosto de 2016) para formar una muestra compuesta. En huertos que contenían árboles propagados en portainjertos (PI) distintos [naranja agrio (*C. aurantium*), limón volkameriano (*C. volkameriana*), swingle (*C. paradisi* x *P. trifoliata*), citrange C-35 (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), Dragón Volador (*P. trifoliata*)], se ubicaron bloques de 20 árboles de cada portainjerto para evaluar incidencia de plantas con síntomas y realizar la colecta de brotes como se describió previamente. Las muestras se envolvieron con papel estéril, se identificaron y colocaron dentro de bolsas de polietileno en una hielera para su traslado al laboratorio.

## **Extracción de ácidos nucleicos**

Se realizó extracción de ácidos totales con el producto Concert™ Plant RNA Reagen (Invitrogen™) (Barbosa *et al.*, 2012) y de RNA total con TRIzol® Reagent (Invitrogen™, AccesoLab<sup>R</sup>) (Rizza *et al.*, 2009) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. La concentración y pureza de los ácidos nucleicos se verificaron con NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer.

## Retrotranscripción-PCR (RT-PCR)

Para *Citrus tristeza virus* (CTV) se emplearon los iniciadores CPKF (5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA3') y CPKR (5' TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC3') que amplifican un fragmento de 273 pb del gen de la cubierta proteica (Rivas *et al.* 2008) por PCR directa. Para *Citrus psorosis virus* (CPsV) se utilizaron los iniciadores Ps66 (5' TCGAAGCTGTATGATGGTGA3') y Ps65 (5' TGCCATCTGGAGTGAGGCT3') que amplifican un fragmento de 430 pb del gen de la cápside de acuerdo con el protocolo de Achachi *et al.* (2015) y Martí *et al.* (2004). En el caso de *Citrus exocortis viroid* (CEVd) se emplearon los iniciadores CEVd-h (5' GGAAACCTGGAGGAAGTCG3') y CEVd-c (5' CCGGGGATCCCTGAAGGA3') siguiendo el protocolo reportado por y el protocolo reportados por (Almeyda *et al.* 2007) que amplifican un fragmento de 370 pb. Para *Citrus cachexia viroid* (CVd-II) se utilizaron los iniciadores CVd-II-h (5' CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC3') y CVd-II-c (5' GCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG3') que amplifican un fragmento de 300 pb (Palacio *et al.*, 1999; Almeyda *et al.*, 2002). Por ultimo *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III) se utilizaron los iniciadores CVd-III-h (5' GGCAGCTAAGTTGGTGACGC3') y CVd-III-c (5' TTCGTCGACGACGACAGGTA3') que amplifican un fragmento de 295 pb (Palacio *et al.*, 1999) por RT-PCR, con las modificaciones siguientes: por cada tubo de PCR se adicionó 0.5 µL del primer R (Ps65, CEVd-c, CVd-II-c, CVd-III-c) en 4.5 µL de agua + 1 µL de RNA molde de cada muestra y se incubó a 72°C por 5 min en termociclador Techne® TC-512. Posteriormente los tubos de colocaron en hielo por 10 min. A cada muestra se adicionaron 4 µL de la mezcla de RT que contenía 2 µL Buffer 5X de M-MLV (PROMEGA) + 1 µL de DTT 10mM (PROMEGA) + 0.5 µL de dNTP's Mix (PROMEGA) + 1.5 µL de M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA),

y se procedió con la Retrotranscripción programando el termociclador a 42°C por 60 min y 72°C por 10 min

La PCR en todos los casos (CTV, CPsV, CEVd, CVd-II y CVd-III) se realizó agregando a cada tubo 9 µL de la mezcla que contenía 2 µL Green buffer GoTaq DNA Polimerasa (PROMEGA), 0.4 µL de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µL de dNTP's, 0.6 µL de primer F respectivo, 0.6 µL de primer R respectivo y 0.1 µL de GoTaq DNA Polimerasa (PROMEGA) + 2 µL de DNA + 5.1 µL de agua.

Se incluyeron testigos positivos de CPsV y CEVd proporcionados por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria perteneciente a la Dirección General de Sanidad Vegetal y el Dr. Ramiro González Garza (Biociencia, S.A. de C.V.), respectivamente.

## **Electroforesis**

Los productos obtenidos de PCR de los virus y viroides se visualizaron en un gel de agarosa al 2% adicionado con bromuro de etidio a 88V durante una hora. El gel se observó y fotografió en transiluminador QUANTUM ST5® (Vilver Lourmat).

## **Secuenciación**

Los productos obtenidos de PCR de virus y viroides se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo las indicaciones del fabricante para su secuenciación.

Se obtuvo una secuencia consenso de cada virus y viroide la cual se comparó con las depositadas en el GenBank.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Área y material vegetativo de estudio

En total se muestrearon 12 huertos de lima persa en siete municipios del estado de Veracruz (Cuadro 1). Se encontraron seis portainjertos: naranjo agrio (*Citrus aurantium*), C-35 (*C. sinensis* x *Poncirus trifoliata*), swingle (*C. paradisi* x *Poncirus trifoliata*), carrizo (*P. trifoliata* x *C. sinensis*), dragón volador (*P. trifoliata*) y limón volkameriano (*C. volkameriana*); en algunos huertos se tuvieron hasta tres portainjertos (Cuadro 1). Asimismo, se observaron diferencias en la edad de los árboles y manejo agronómico de los huertos recorridos. Para análisis, el manejo agronómico se agrupó en tres tipos: a) Tecnificado en donde se tenía calendarización de riego, fertilización, poda y cosechas por año; b) Semi-tecnificado consistente en sistema de riego y podas; c) No tecnificado en el cual no se tenía sistema de riego, solo podas.

### Muestreo y evaluación de incidencia

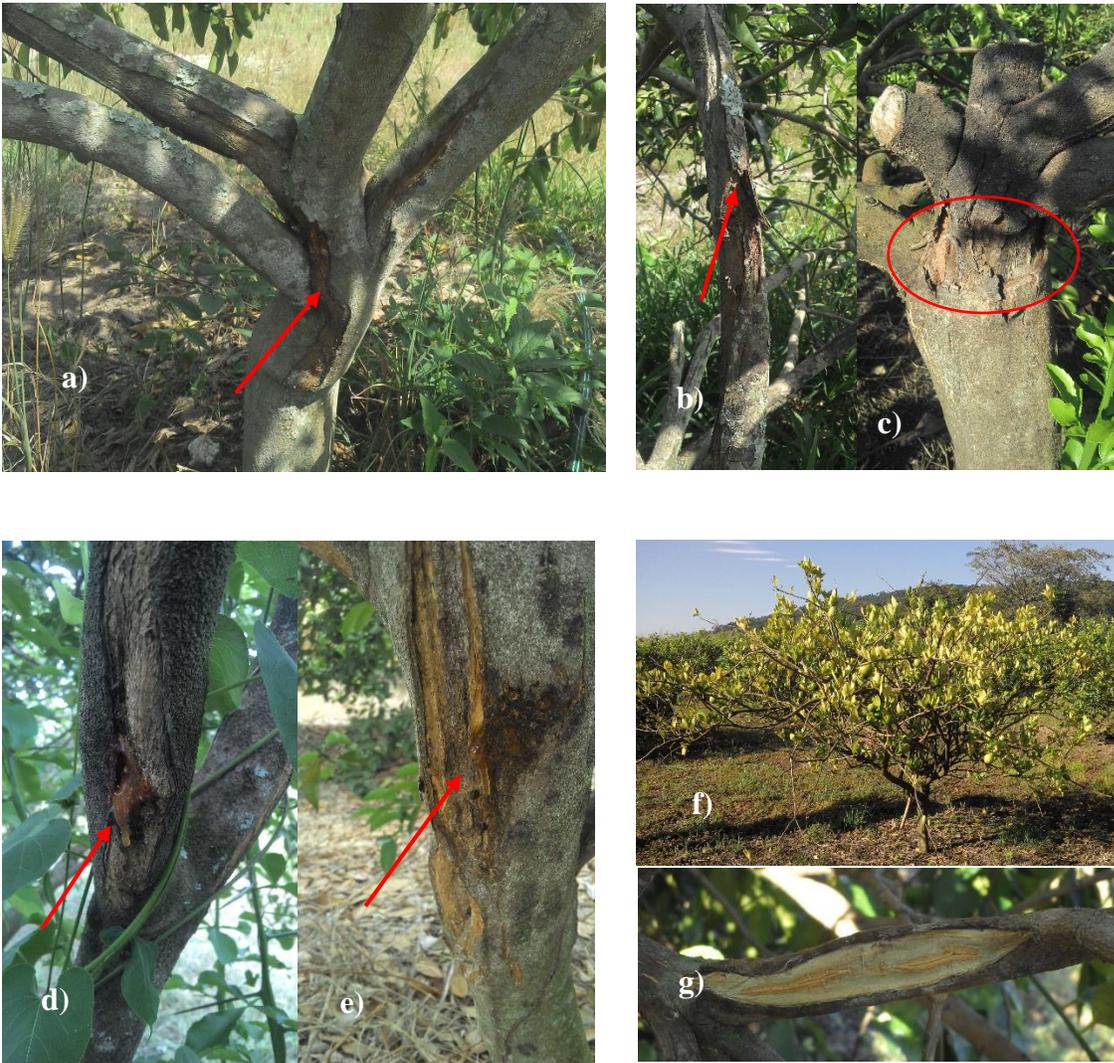
Los síntomas observados en los huertos muestreados fueron agrietamiento y descortezamiento del tronco y ramas principales, muerte de ramas terminales y presencia de goma (Figura 4). Con base en lo anterior, en cada huerta se evaluó la incidencia de árboles que mostraron estos síntomas. Se encontró que por portainjerto fluctuó de 0 a 100% en árboles  $\geq 4$  años, siendo más alta en limón volkameriano de Martínez de la Torre, naranjo agrio en Atzalan y trifoliado en

Amatlán de los Reyes (100%) y menor en naranjo agrio de una plantación nueva (menos de un año) en Cazones (0%) (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Manejo agronómico y portainjertos encontrados en los huertos muestreados para la detección de *Citrus tristeza virus*, *Citrus psorosis virus*, *Citrus exocortis viroid*, *Citrus cachexia viroid* y *Citrus dwarfing viroid* en siete municipios del estado de Veracruz.

Municipio	Nombre del huerto <sup>2</sup>	Ubicación geográfica	Portainjerto <sup>3</sup>	Clave
CZ	El bohemio <sup>a</sup>	20°42'778"	NA plantación vieja	1
CZ	El bohemio <sup>a</sup>	20°42'702"	NA plantación nueva	2
CZ	El bohemio <sup>a</sup>	20°42'476"	C-35	3
MT eMT	San Rafael <sup>b</sup>	20°08'550"	S	4
MT eMT	San Rafael <sup>b</sup>	20°08'551"	C	5
MT eMT	San Rafael <sup>b</sup>	20°08'458"	DV	6
MT eC	El Rapadero <sup>b</sup>	20°06'484"	LV	7
MT eC	El Rapadero <sup>b</sup>	20°06'484"	DV	8
AT	Avión <sup>a</sup>	19°59'747"	LV	9
AT	Avión <sup>a</sup>	19°59'736"	S	10
AT	Avión <sup>a</sup>	19°59'935"	NA	11
SR	Santa Michelle <sup>b</sup>	20°10'407"	NA	12
SR	Santa Michelle <sup>b</sup>	20°10'193"	S	13
SR	Santa Michelle <sup>b</sup>	20°10'229"	DV	14
MS	Ejido vega redonda <sup>b</sup>	20°08'667"	C-35	15
MT eC	Santa fe <sup>c</sup>	20°05'910"	NA	16
CT	Vivero rincón <sup>b</sup>	18°50'357"	NA	17
CT	Hermanos Nava <sup>c</sup>	18°50'207"	NA	18
CT	Ejido San Juan de la punta <sup>b</sup>	18°48'713"	NA	19
CT	Rancho Asunción <sup>c</sup>	18°46'198"	NA	20
AR	Colegio de Postgraduados Campus Córdoba <sup>b</sup>	18°51'765"	T	21
CT	Vivero rincón <sup>b</sup>	18°50'357"	NAE	22

<sup>1</sup>CZ: Cazones, MT eMT: Martínez de la Torre-ejido María de la Torre, MT eC: Martínez de la Torre-ejido Cañadas AT: Atzalán, SR: San Rafael, MS: Misantla, CT: Cuitláhuac, AR: Amatlán de los Reyes. <sup>2</sup>Manejo agronómico <sup>a</sup>Tecnificado, <sup>b</sup>Semitecnificado y <sup>c</sup>No tecnificado <sup>3</sup>NA: Naranjo agrio (*Citrus aurantium*), C35: (*Citrus sinensis* x *Poncirus trifoliata*), S: Swingle (*Citrus paradisi* x *P. trifoliata*), C: Carrizo (*P. trifoliata* x *C. sinensis*), LV: limón volkameriano (*Citrus volkameriana*), DV: Dragón volador (*P. trifoliata*), T: trifoliado, NAE: Naranjo agrio especial.

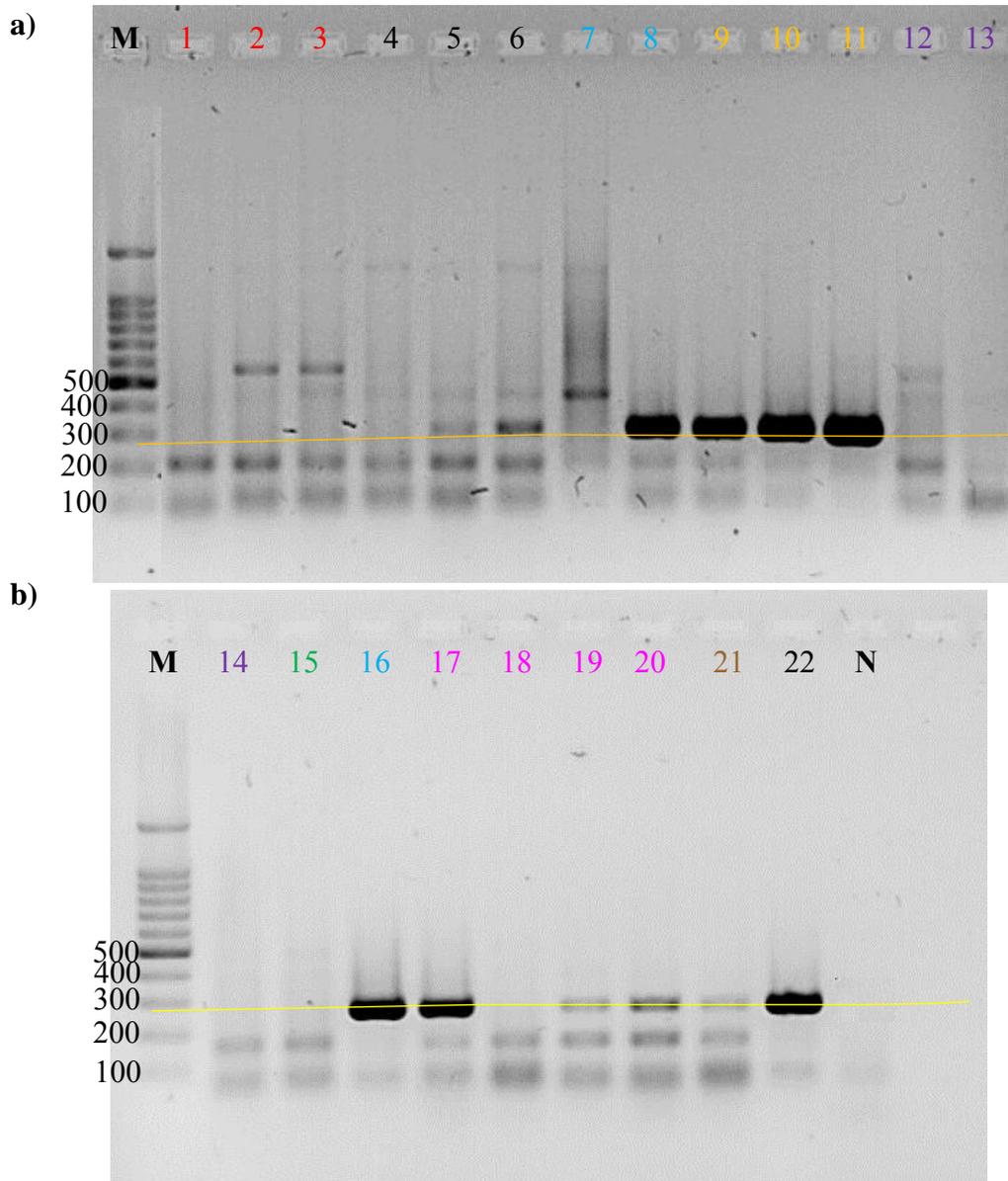


**Figura 4.** Síntomas observados en campo: a) agrietamiento de ramas principales; b) descortezamiento de rama; c) descortezamiento del tronco principal del injerto; d) agrietamiento de rama con exudado gomoso; e) agrietamiento del tronco principal y presencia de goma; f) amarillamiento y muerte de ramas terminales; g) agrietamiento de rama del tercer orden.

### Tristeza de los cítricos

En el presente estudio se analizaron en total 22 muestras compuestas de cinco arboles de lima persa, colectadas de los siete municipios del estado de Veracruz (Cazones, San Rafael, Martínez de la Torre, Misantla, Atzalan, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes). En 12 muestras se

obtuvo el fragmento esperado de 273 pb para *Citrus tristeza virus*, procedentes de los municipios de Martínez de la Torre, Atzalan, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes (Figura 5). Cuatro muestras que amplificaron el fragmento fueron secuenciadas y se tuvo de 94 a 97% de identidad con *Citrus tristeza virus* al compararlas con la base de datos del Gen Bank.



**Figura 5.** Producto de PCR obtenidos con primers específicos para u en las muestras 1-13 (a) y 14-22 (b) que amplifican un fragmento de 273 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.

El primer reporte de la tristeza de los cítricos en México fue en el estado de Tamaulipas en 1983. Los informes de SENASICA mencionan que hasta 2014 se habían detectado plantas positivas a VTC en 21 de las 24 entidades donde se cultivan cítricos (SENASICA, 2014). ([publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento...true](http://publico.senasica.gob.mx/includes/asp/download.asp?IdDocumento...true)). En el municipio de Cuitláhuac los árboles que fueron positivas a CTV mostraban amarillamiento, declinamiento y ramas terminales secas (Figura 6), mientras que en los demás municipios no se observó amarillamiento pero si muerte de ramas terminales, esto pudo deberse al grado de tecnificación que se tiene en cada huerto. En Colombia se observó que árboles de lima Tahití positivos a CTV tenían hojas de tamaño reducido, clorosis intervenal, declinamiento y amarillamiento generalizado (Quiroga *et al.*, 2010). Debido a que la región de estudio se utilizan diversos portainjertos, orígenes de la planta y manejo agronómico, los árboles muestran deficiencias nutrimentales que pueden confundirse con síntomas de tristeza por lo que es difícil atribuirlos al CTV.

El portainjerto más usado en la zona de estudio fue naranjo agrio (*C. aurantium*). Moreno *et al* (2008) mencionan que en naranjos, mandarinos y pomelos injertados en naranjo agrio e infectados con CTV es común observar declinamiento, amarillamiento y muerte de los árboles en unas cuantas semanas, síntomas que no fueron observados en los árboles analizados en los cuatro municipios donde se encontraron muestras positivas a CTV. Otros portainjertos usados en la región de estudio son considerados tolerantes como es el caso de Swingle, Carrizo, Volkameriano y Dragón Volador (Bar-Joseph *et al.*, 1989; Laino *et al.*, 2016).



**Figura 6.** Síntomas observados en huertos de Cuitláhuac y Martínez de la torre: a) amarillamiento y muerte de ramas terminales; b) muerte de ramas generalizado; c) muerte de árbol con hojas secas, frutos y frutos amarillos adheridos; d) muerte de ramas terminales y decaimiento del árbol.

Una de las causas por las que algunas muestras no fueron positivas a CTV, pudo deberse a que no está presente el virus, o bien, a que la época y tipo de muestreo no fueron los adecuados.

En el caso de España, no se recomienda realizar el muestreo de árboles para detección de CTV en épocas muy cálidas porque hay resultados inconsistentes debido a la baja replicación del virus (Cambra *et al.*, 2000). Asimismo, es posible que el ARN tuviera contaminantes que inhibieron la reacción de PCR (Rivas *et al.*, 2008). La presencia del CTV en los huertos estudiados pudo tener su origen desde el establecimiento de los mismos, ya que algunos productores comentaron que no siempre adquirían plantas certificadas. Aun cuando con fundamento en la Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, se implementó la campaña contra el Virus Tristeza de los Cítricos, en la cual se contemplan acciones de muestreo y diagnóstico del patógeno en plantas de huertos comerciales, de traspatio y viveros, lo que ha permitido la detección y eliminación de 12,600 plantas positivas. Considerando que la estrategia más viable para la prevención del daño por este virus es el uso de portainjertos tolerantes (aunque susceptibles a cachexia, exocortis y psorosis), se implementó el Programa Nacional de Certificación de Material Propagativo de Cítricos, fundamentado en la Norma Oficial Mexicana NOM-079-FITO- 2002 y en la actualidad se cuenta con aproximadamente 100 unidades certificadas bajo este esquema, los resultados obtenidos muestran que ambas normas no se han aplicado eficientemente.

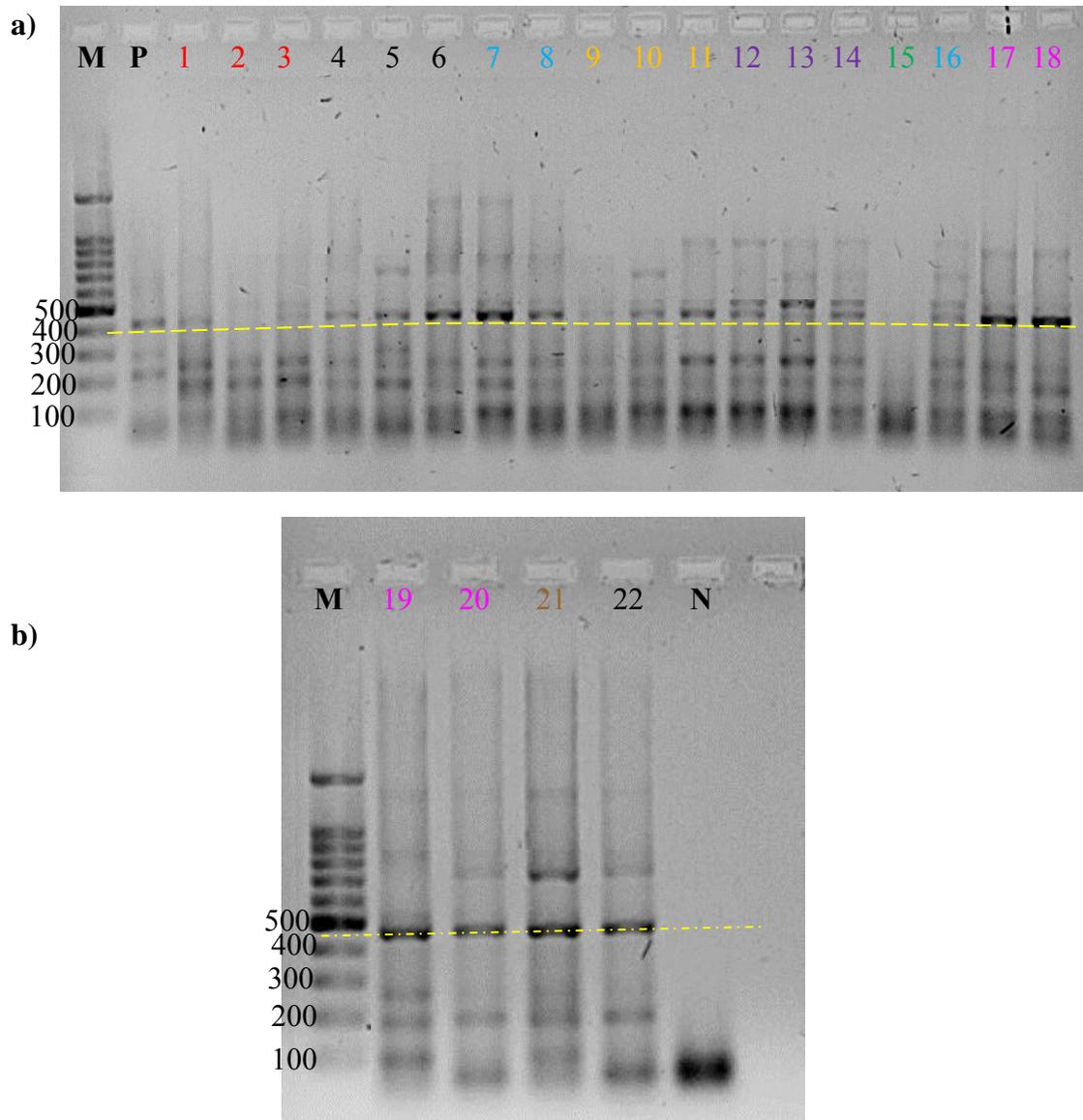
En los municipios muestreados había plantas injertadas en naranjo agrio (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael y Cuitláhuac), se observaron síntomas en lima persa, pero en diferente intensidad dependiendo de la tecnificación del cultivo, en Cazones, Atzalan y San Rafael se observó amarillamiento de hojas 50% de la plantación, mientras que, en Cuitláhuac fue 80% con amarillamiento generalizado y muerte de ramas terminales de lima persa: Cuando los portainjertos fueron Dragón Volador (San Rafael y Martínez de la Torre), C-35, swingle y carrizo (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael y Misantla) los síntomas fueron amarillamiento y solo en algunos casos muerte de ramas, la incidencia varió de 10 a 60%.

## Psorosis

De las 22 muestras analizadas, 18 amplificaron para *Citrus psorosis virus* procedentes de los municipios de Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes (Figura 7). Cuatro muestras que amplificaron el fragmento esperado 430 pb, fueron secuenciadas y tuvieron 97% de similitud con *Citrus psorosis virus* al compararse con la base de datos del GenBank.

De las cuatro muestras que resultaron negativas (2, 3, 9 y 15), las primeras dos procedían del municipio de Cazonas del huerto “El Bohemio” [plantación nueva injertada en naranjo agrio y plantación injertada en C-35 (plantas provenientes de vivero certificado)]; la tercera muestra fue del municipio de Atzalan del huerto “El Avión” con portainjerto limón volkameriano y la última muestra pertenecía al municipio de Misantla del huerto “Ejido Vega Redonda” injertadas en C-35 (plantas provenientes de vivero certificado). El hecho de que tres muestras negativas provengan de vivero certificado, muestra que el origen del material vegetativo es importante para la presencia de la enfermedad.

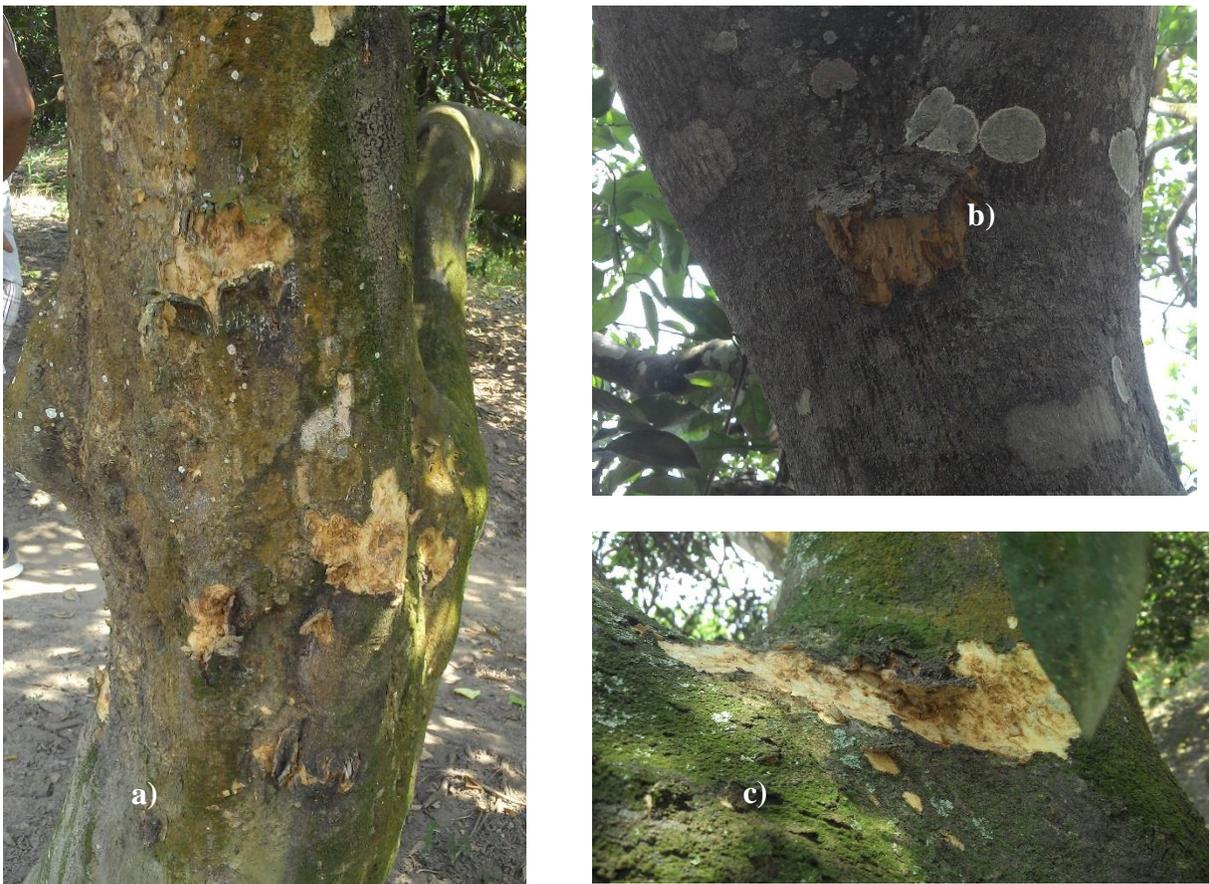
En México existen dos reportes de la presencia de psorosis en el estado de Nuevo León en huertos de naranja Mars con más de 20 años (Barragán *et al.*, 2008; Iracheta *et al.*, 2004). Por su parte SAGARPA y SENASICA informan que la psorosis se encuentra en plantaciones comerciales de todo el país (Guerrero *et al.*, 2013). Cabe indicar que el periodo de incubación de la psorosis en naranja es de más de 10 años después de los cuales se observa descamación de la corteza del tronco y manchas en las hojas jóvenes (Achachi *et al.*, 2014; Barragán *et al.*, 2008; Iracheta *et al.*, 2004; Martí *et al.*, 2004).



**Figura 7.** Productos de la PCR obtenidos con iniciadores específicos para Citrus psorosis virus en las muestras 1-18 (a) y 19-22 (b) que amplifican un fragmento de 430 pb. P: testigo positivo. M: marcador molecular de 100 pb. N: testigo negativo agua.

En lima persa se desconocen los síntomas ocasionados por esta enfermedad, no obstante, en esta investigación algunos de los árboles que fueron positivos a CPsV mostraban descamación y clorosis (Figura 8), mientras que otros fueron asintomáticos, lo cual pudo deberse a que se encontraban injertadas en materiales considerados tolerantes como naranjo agrio (*C. aurantium*) y

limón rugoso (*C. jambhiri*), o bien, al grado de tecnificación (principalmente nutrición) que se tiene (Iracheta *et al.*, 2004; Roistacher, 1933). En estudio realizaron en Tucuman, Argentina, se observó descortezamiento del tronco y ramas y en algunos casos anillos cloróticos en hojas y frutos así como tinción de la madera en arboles de naranjo, mandarino y pomelo, mientras que en los portainjertos naranjo agrio y limón rugoso no presentaban síntomas (Figuroa *et al.*, 2009).



**Figura 8.** Síntomas observados en tronco principal: a, b y c) descortezamiento del tronco de lima persa

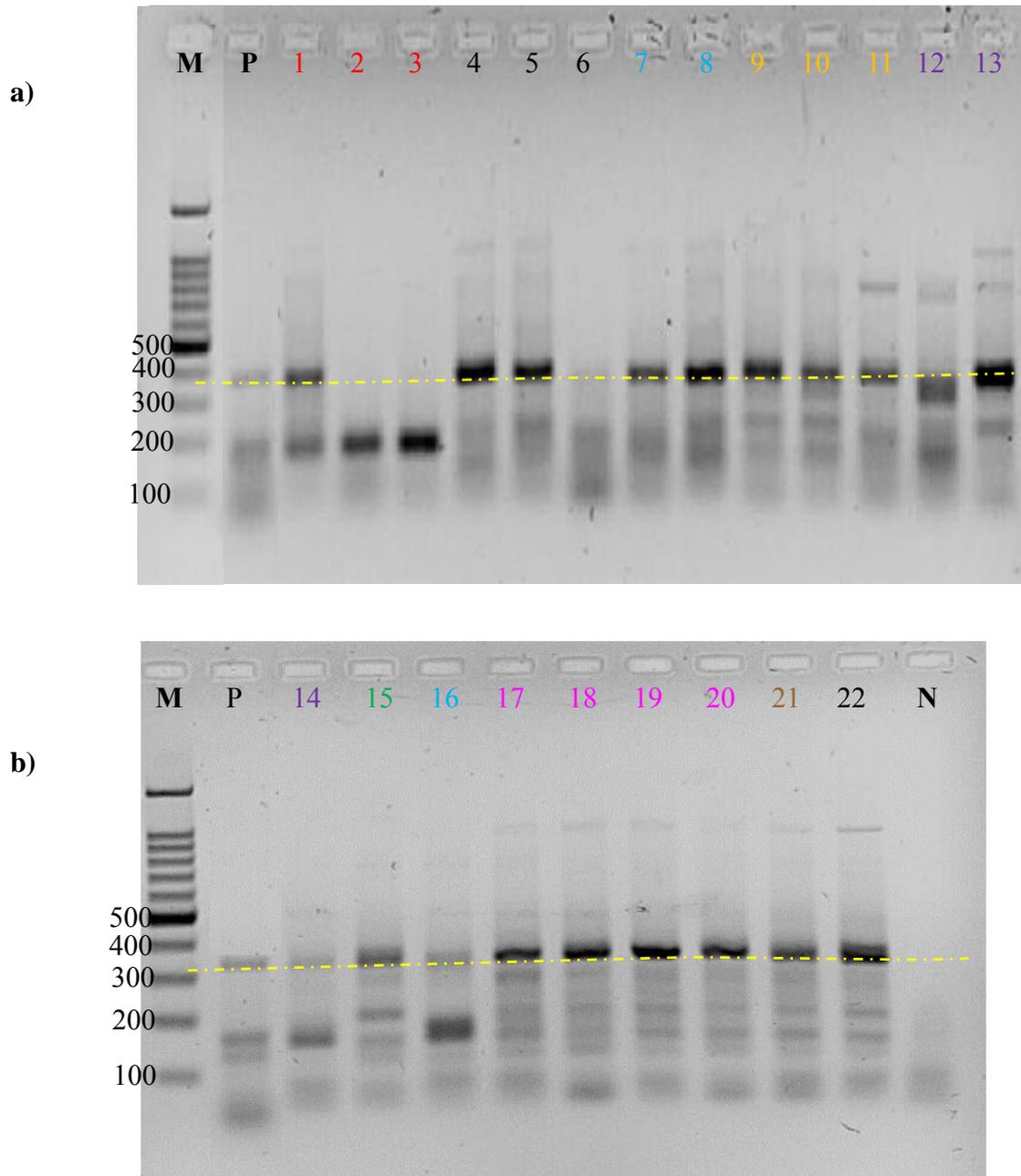
En huertos de Cazonés y Atzalan, las plantas injertadas en naranjo agrio, solo se observó descortezamiento, que parecía no afectar la producción debido a la tecnificación del cultivo en dichos municipios, mientras que, en Martínez de la Torre, San Rafael y Cuitláhuac, plantas

injertadas en naranjo agrio, únicamente presentaron descortezamiento y agrietamientos el injerto. Cuando el portainjerto fue, Dragón Volador (San Rafael y Martínez de la Torre), C-35, swingle y carrizo (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Misantla) los síntomas fueron descortezamiento en diferentes grados de intensidad, la incidencia varió de 50 a 80%.

Debido a que en esta investigación las plantas positivas a psorosis también lo fueron para exocortis, no es posible asociar algún síntoma a cualquiera de las enfermedades.

### **Exocortis**

En el caso de *Citrus exocortis viroid*, 20 de las 22 muestras procedentes de los municipios de Cazones, San Rafael, Martínez de la Torre, Misantla, Atzalan, Cuitláhuac, y Amatlán de los Reyes, amplificaron el fragmento esperado de 370 pb y dos procedentes del huerto “El Bohemio” del municipio de Cazones no se tuvo amplificación (Figura 9). Estos resultados negativos pudieron deberse a que no está presente el viroide, o bien, a la distribución asintomática del mismo en el dosel del árbol. Las muestras amplificadas en los municipios de Cazones, Martínez de la Torre, San Rafael, Misantla y Cuitláhuac tuvieron 99% de similitud con *Citrus exocortis viroid* en la base de datos del GenBak.

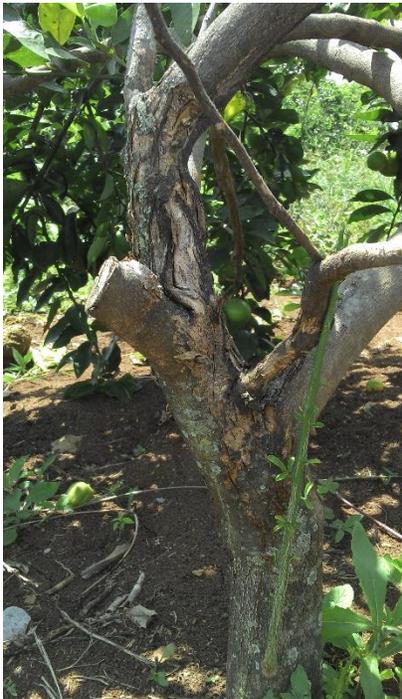


**Figura 9.** Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Citrus exocortis* viroid en las muestras 1-13 (a) y 14-22 (b) que amplifican un fragmento de 370 pb. P: testigo positivo; M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.

La exocortis es una de las limitantes sanitarias severas de los cítricos, distribuida en la mayoría de las zonas productoras del mundo, donde no funcionan los programas de saneamiento

y producción de material de cítricos certificados (Lin *et al.*, 2015). Se ha observado que en naranjo dulce (*C. sinensis*) y mandarina (*C. reticulata*) puede reducir el rendimiento hasta 50% además de causar declinamiento del vigor, agrietamiento de la corteza y eventualmente muerte de los árboles (Almeyda *et al.*, 2007). Estos síntomas son más evidentes en materiales injertados en portainjertos susceptibles como *Poncirus trifoliata*, citrange Troyer (*C. sinensis* x *P. trifoliata*), citrange Carrizo (*C. sinensis* x *P. trifoliata*) y lima Rangpur (Elleuch *et al.*, 2006). En todas las huertas muestreadas en la presente investigación se observaron diferentes grados de descortezamiento, así como agrietamientos de la corteza del tronco y ramas principales de lima persa, por lo que podemos señalar que es susceptible a esta enfermedad (Figura 10), por lo anterior, al ocasionar daño en la corteza, puede permitir el ingreso de *Phytophthora* spp., y el oomiceto mostrar la secreción de goma característica que observa el productor y asocia como causante de la muerte de plantas. Debido a lo anterior, la detección oportuna de este patógeno es fundamental para optimizar el manejo de la exocortis.

En México solo existe un reporte de viroides asociados a lima persa en los estados de Yucatán, Veracruz, Tabasco y Colima, mediante RT-PCR. En el cual se detectó al CEVd en 20 de 30 muestras analizadas (Almeyda *et al.*, 2002), pero no indica los Municipio en los que se realizaron los muestreos, la edad de los árboles, ni los portainjertos encontrados. (Guerrero *et al.*, 2013) reportan que en 50% de las plantaciones comerciales de naranja (*C. sinensis*) en Nuevo León y Tamaulipas se encuentra el CEVd y que posiblemente se encuentre en porcentajes similares en cítricos dulces en todo el país y en forma endémica en la mayoría de las plantaciones de lima persa. Sin embargo, es necesario realizar más trabajos al respecto para corroborar lo anterior.



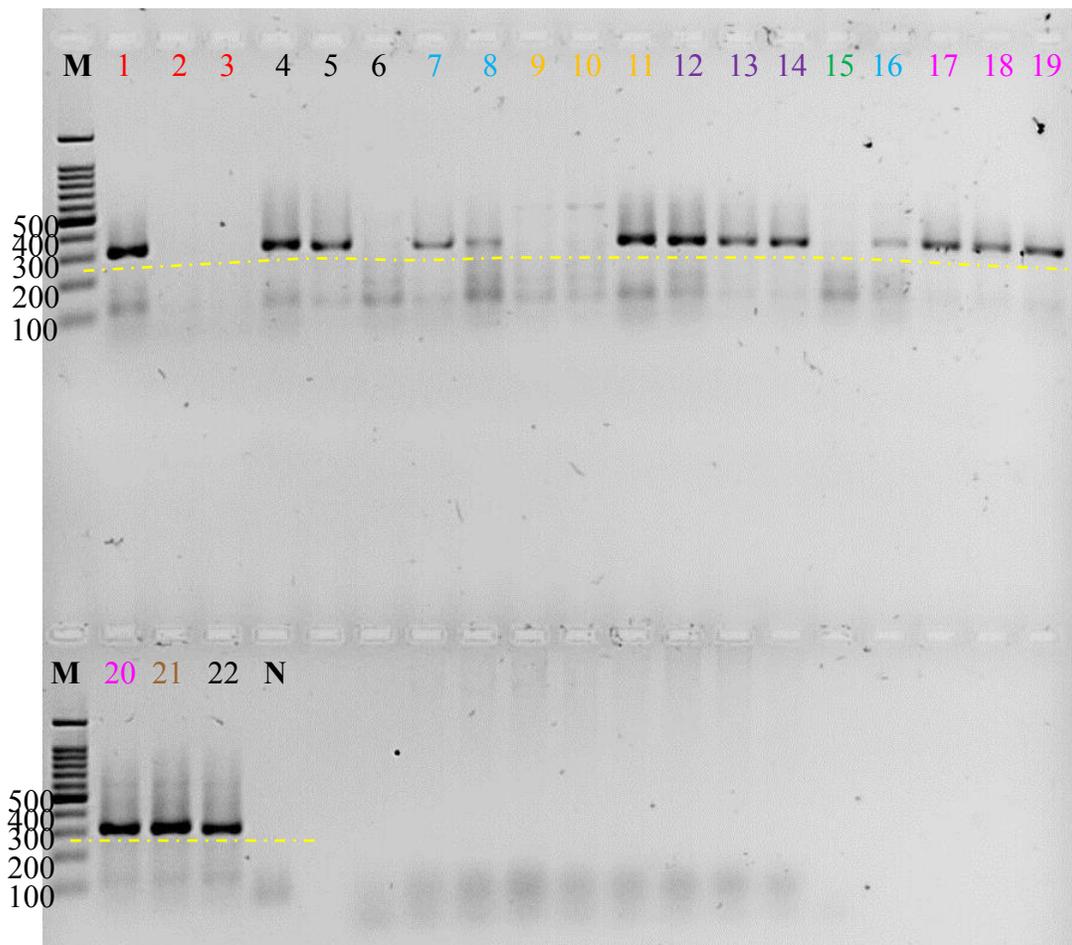
**Figura 10.** Síntomas observados en tronco principal del portainjerto e injerto: a) agrietamiento y descortezamiento de ramas principales de *L. persa*; b) descortezamiento de tronco principal del injerto; c) agrietamiento del portainjerto y cultivar; d) descortezamiento del portainjerto.

Dado que CEVd se encontró en todos los municipios estudiados, es importante que el establecimiento de nuevas plantaciones o reposiciones se realicen con las plantas propagadas con material vegetal certificado y se realicen inspecciones periódicas de las mismas de acuerdo con la NOM-079-FITO-2002 para limitar su dispersión. También es importante desinfestar las herramientas de corte durante las prácticas de poda comunes en este cultivo. La diseminación involuntaria de esta viroide es mayor cuando la combinación patrón-injerto no permite observar de síntomas en el portainjerto, lo que ocurre cuando lima persa cuando ésta injerta en naranjo agrio (*C. aurantifolia*) (Almeyda *et al.*, 2003), o bien, debido al prolongado periodo de incubación (Barkley, 2008). Cabe indicar que anteriormente las plantas de lima persa morían después de 10 años, pero actualmente ocurre desde los cinco años, lo que hace que esta actividad sea cada vez menos rentable y debido a la falta de conocimiento por parte de los productores y técnicos este problema no se ha atendido como corresponde y siguen utilizando material no certificado, además se mantiene la producción de plantas en viveros no certificados a cielo abierto.

En los municipios muestreados había plantas injertadas en naranjo agrio (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael y Cuitláhuac), sólo se observaron síntomas en lima persa, pero en diferente intensidad dependiendo de la tecnificación del cultivo, en Cazones, Atzalan y San Rafael se observó descortezamiento de ramas principales en 55% de la plantación, mientras que, en Cuitláhuac fue 100% con descortezamiento y agrietamientos del tronco y ramas principales de lima persa: Cuando el portainjerto fue, Dragón Volador (San Rafael y Martínez de la Torre), los síntomas se observaron en el portainjerto y lima persa en 90% de los árboles evaluados. En huertos donde el portainjerto fue C-35, swingle y carrizo (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Misantla) los síntomas fueron agrietamientos y descortezamiento en tronco y ramas principales de lima persa la incidencia varió de 50 a 80%.

## Cachexia

Por otro lado, 16 muestras pertenecientes a los municipios de Cazonos, Martínez de la Torre, San Rafael, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes amplificaron el fragmento esperado de 300 pb para *Citrus viroid II* (Figura 11) y las secuencias obtenidas de cuatro muestras tuvieron de 96 a 100% de similitud con el viroide en la base de datos del GenBak.



**Figura 11.** Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Citrus viroid II* que amplifican un fragmento de 300 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.

Los resultados negativos pudieron deberse a que la época y tipo de muestreo no fueron los adecuados. Reichert y Perlberger (1934) observaron picado del tronco de lima dulce de "Palestina" (*C. limettioides*) asociados al viroide (Eiras *et al.*, 2013). Cabe indicar que nosotros no observamos picado de tronco, sin embargo, en todas las huertas vimos descortezamiento en ramas de tercer y cuarto orden.

Las plantas de cítricos afectadas por cachexia muestran decoloración del floema, picado del tallo, rajaduras y descortezamiento de ramas, enanismo, clorosis y declinamiento que conlleva a la muerte. Esta enfermedad afecta mandarinas (*Citrus reticulata*), clementinas (*C. clementina*), satsumas (*C. unshiu*), algunos híbridos de mandarina como tangelos (*C. paradisi* x *C. reticulata*) (Serra *et al.*, 2008). En virtud de que observamos algunos de los síntomas antes señalados, podemos indicar que lima persa es susceptible a cachexia y que la virulencia del viroide dependerá de la combinación injerto portainjerto.

Previamente se había reportado a este viroide asociado a lima persa en los estados de Yucatán, Veracruz, Tabasco y Colima (Almeyda *et al.*, 2002), sin embargo no mencionan la edad de las plantaciones, portainjertos y municipios en donde se colectaron sus muestras. (Guerrero *et al.*, 2013) mencionan que cachexia se encuentra en forma endémica en la mayoría de las plantaciones de lima persa y en forma asintomática en cítricos dulces del país. Como ya se mencionó, la cachexia induce típicamente picado del tallo así como retraso del crecimiento, clorosis y decaimiento en especies susceptibles como mandarina o sus híbridos, *C. macrophylla*, limón rugoso (*C. jambhiri*) y lima Rangpur (Malfitano *et al.*, 2005) y lima persa (Almeyda *et al.*, 2002). En la mayoría de las plantaciones muestreadas no se observaron síntomas en los portainjertos *C. aurantium*, *C. volkameriana*, y C-35 debido a que se consideran tolerantes al

viroide (Barbosa et al., 2005), además de que los síntomas de agrietamientos solo se observaron en las ramas de tercer y cuarto orden de lima persa (Figura 12).



**Figura 12.** Síntomas observados en ramas: a, b y c) agrietamiento de ramas de segundo, tercer orden y terminales de lima persa.

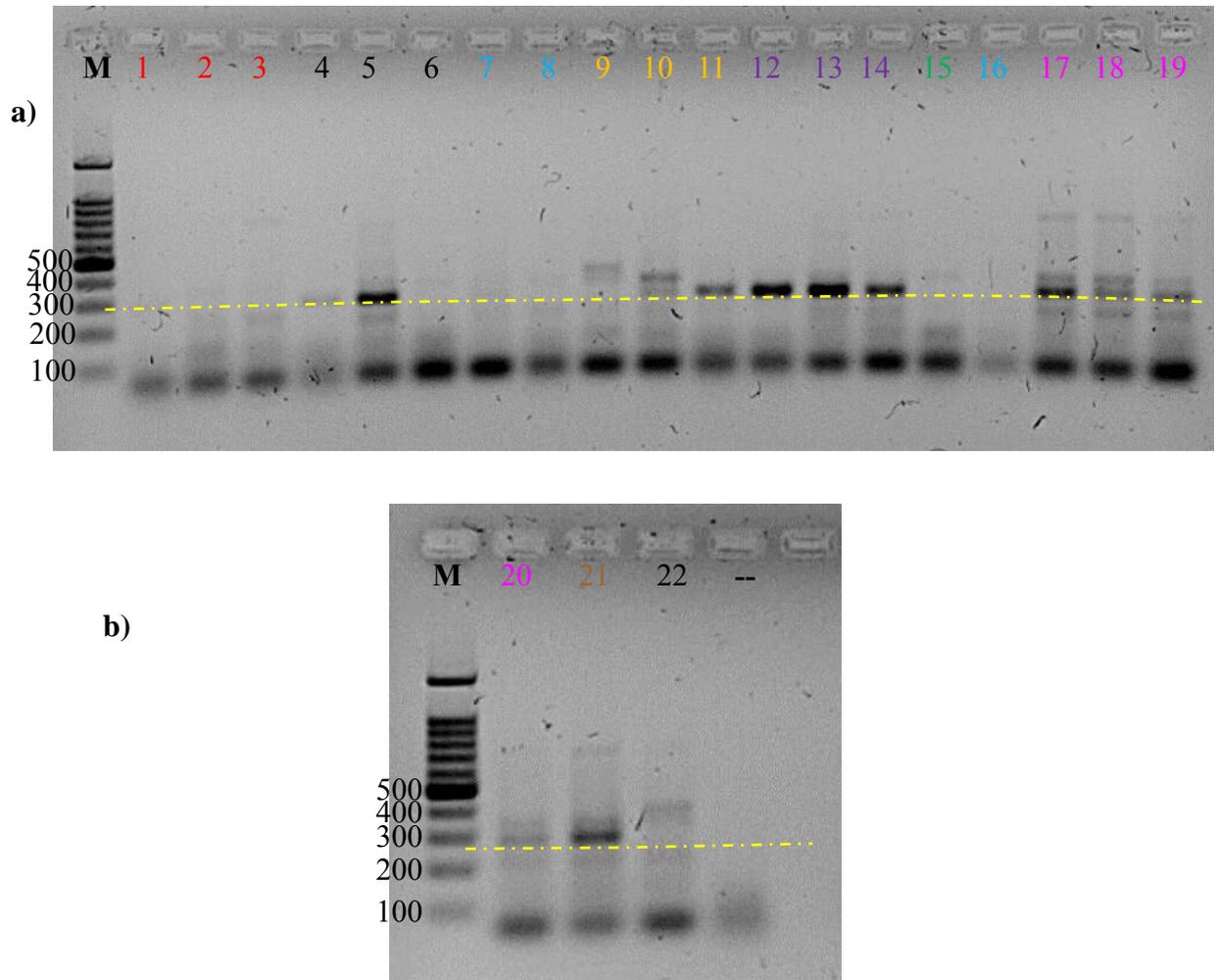
En huertos de Cazonés y Atzacan, las plantas injertadas en naranjo agrio, solo se observó agrietamiento de ramas de tercer y cuarto orden (80-100%), que parecía no afectar la producción debido a la tecnificación del cultivo en dichos municipios, mientras que, en Martínez de la Torre, San Rafael y Cuitláhuac, plantas injertadas en naranjo agrio presentaron descortezamiento y agrietamientos de ramas del primer al cuarto orden de lima persa: Cuando el portainjerto fue, Dragón Volador (San Rafael y Martínez de la Torre), los síntomas únicamente se observaron en

ramas de cuarto orden de lima persa en 80% de los árboles evaluados. En huertos donde el portainjerto fue C-35, swingle y carrizo (Cazones, Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Misantla) los síntomas fueron agrietamientos de ramas de tercer y cuarto orden de lima persa la incidencia varió de 60 a 90%.

## **Enanismo**

En el caso de *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III) se tuvo amplificación en 11 muestras pertenecientes a los municipios de Martínez de la Torre, Atzalan, San Rafael, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes (Figura 13). Las secuencias obtenidas de cuatro muestras tuvieron 99% de similitud con este viroide.

En México se detectó *Citrus dwarfing viroid* en 11 de 30 muestras de lima de los estados de Yucatán, Veracruz, Tabasco y Colima (Almeyda *et al.*, 2002) y se desconoce su presencia en otras entidades productoras de cítricos, así como su efecto en la producción. En naranja navel (*Citrus sinensis*) injertada en *Poncirus trifoliata* infectada con CVd-III puede reducir el tamaño del árbol y su rendimiento, pero sin afectar el tamaño y apariencia del fruto, sus características organolépticas o el tiempo de maduración (Vidalakis *et al.*, 2011) lo cual pudiera estar asociado con la baja variabilidad que tiene este viroide. En un estudio para conocer la variabilidad de CVd-III, se inocularon plantas y después de 25 años se encontró que su secuencia era prácticamente la misma en naranja trifoliada, citrange troyer, citron etrog y naranja dulce naveliana, mientras que en limón interdonato y limón volkameriano la secuencia fue totalmente diferente a la inoculada (Tessitori *et al.*, 2013).



**Figura 13.** Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Citrus dwarfing viroid* en las muestras 1-19 (a) y 20-22 (b) que amplifican un fragmento de 295 pb. M: marcador molecular de 100 pb; N: testigo negativo agua.

## Resultados generales

Vernière *et al.* (2004) y Rizza *et al.* (2009), indicaron que infecciones mixtas de CVd-III con CBLVd, HSVd, y CVd IV no provocan síntomas, mientras que, en presencia de CEVd y CVd-III hay reducción significativa del crecimiento y rendimiento. Considerando que algunos árboles

analizados en el presente estudio resultaron positivos al CVd-III y CVd-III, es posible que su producción esté siendo afectada negativamente, pero los productores que se han percatado.

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman la presencia de CTV, CPsV, CEVd, CVd-II y CVd-III en todas las huertas de lima persa de los siete municipios de Veracruz incluidos en el estudio (Cuadro 2). Los árboles infectados por virus y viroides mostraron consistentemente agrietamiento de la corteza de ramas y tallos, en algunos casos combinado con clorosis y reducción del crecimiento, como se ha reportado previamente (Panno *et al.*, 2014).

Dado que la productividad de lima persa también está en función de la relación portainjerto-cultivar, es necesario elegir la combinación más adecuada considerando su adaptación agronómica y susceptibilidad a estos patógenos. La menor incidencia de estos virus y viroides se observó en una plantación nueva injertada en naranjo agrio en el municipio de Cazones (portainjerto susceptible a CTV pero tolerante a viroides), contrario a los portainjertos trifoliados como Troyer Citrange, lima Rangpur (*C. limonia*) y naranjo trifoliado (*P. trifoliata*) que son altamente susceptibles a CEVd (Lin *et al.*, 2015; Panno *et al.*, 2014).

La presencia simultánea de CTV, CPsV, CEVd, CVd II y CVd III en la misma plantación sugiere que los productores están empleando material de propagación infectado y que no desinfectan herramienta de poda, esto significa que no tienen conocimiento que las enfermedades están presentes y desconocen que acciones se deben llevar a cabo para mitigar o resolver el problema, que puede estar relacionado con la presencia de otras enfermedades como tristeza (CTV) que deben ser determinadas.

**Cuadro 2.** Detección de *Citrus tristeza virus* (CTV), *Citrus psorosis virus* (CPsV), *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus cachexia viroid* (CVd-II), *Citrus dwarfing viroid* (CVd-III) en siete municipios productores de lima persa (*Citrus latifolia*) en Veracruz, México.

Municipio/Huerto/ha	<sup>z</sup> Portainjerto	Porcentaje de árboles con síntomas	CTV	CPsV	CEVd	CVd II	CVd III
Cazones/ <i>El Bohemio/250</i>	1.NA	55	-	-	+	+	-
	2.NA	0	-	-	+	-	-
	3.C-35	60	-	-	-	-	-
Martínez de la Torre-María De La Torre/ <i>San Rafael</i>	4.Sw	85	-	+	+	+	+
	5.Ca	95	+	+	+	+	-
	6.DV	80	+	+	+	-	-
Martínez de la Torre-Cañadas/ <i>El Rapadero/50</i>	7.LV	100	-	+	+	+	-
	8.DV	90	+	+	+	+	-
Atzalán/ <i>Avión/48</i>	9.LV	50	+	+	+	-	-
	10.Sw	60	+	+	+	-	-
	11.NA	100	+	+	+	+	+
San Rafael/ <i>Santa Michelle/17</i>	12.NA	50	-	+	+	+	+
	13.Sw	90	-	+	+	+	+
	14.DV	10	-	-	+	+	+
Misantla/ <i>Ejido Vega Redonda/1</i>	15.C35	90	-	-	+	+	-
Martínez de la Torre-Cañadas/ <i>Santa Fé/2</i>	16.NA	80	+	+	+	+	-
Cuitláhuac/ <i>Vivero Rincón/4.8</i>	17.NA	80	+	+	+	+	+
Cuitláhuac/ <i>Hermanos Nava/5</i>	18.NA	65	+	+	+	+	+
Cuitláhuac/ <i>Ejido San Juan de la Punta/5</i>	19.NA	90	+	+	+	+	+
Cuitláhuac/ <i>Rancho Asunción/5</i>	20.NA	80	+	+	+	+	+
Amatlán de los Reyes/ <i>CP Campus Córdoba/1</i>	21.	100	+	+	+	+	+

<sup>z</sup> Portainjertos: Swingle (Sw), limón volkameriano (LV), naranjo agrio (NA), Dragón Volador (DV), C-35, Carrizo (Ca).

## CONCLUSIONES

En los huertos de lima persa de los municipios de Cazonos, Martínez de la Torre, San Rafael, Misantla, Atzalan, Cuitláhuac y Amatlán de los Reyes se encontraron: CTV, CPsV, CEVd, CVd II y CVd III.

Las plantaciones de Cuitláhuac mostraron síntomas más evidentes de agrietamientos, descamaciones y muerte de ramas terminales. En las muestras de este Municipio se detectaron los cinco patógenos en estudio.

En los huertos de los municipios de Cazonos y Misantla los árboles mostraron síntomas menos severos.

La presencia simultánea de estos patógenos en la misma plantación sugiere que se está empleando material de propagación infectado y herramienta contaminada.

CPsV, CEVd y CVd-II provocan descortezamiento y agrietamiento de tronco, ramas principales y terminales que hacen que la planta tenga aperturas en donde puede entrar *Phytophthora* spp., u otros patógenos, es decir se vuelven vulnerables ante cualquier plaga, sin olvidar que VTC y CVd-III no generan agrietamientos ni descortezamiento pero si debilitan la planta.

El exudado gomoso que se genera en las plantas por la infección de *Phytophthora* spp. es el síntoma más notorio para los productores, quienes asocian la muerte de las plantas a dicho oomiceto, sin saber que pueden haber otras causas. Con esta investigación podemos decir que la muerte de las plantas de lima persa en Veracruz se debe a más de un patógeno.

Este es el primer reporte de la presencia de estos patógenos en lima persa en Veracruz México.

## BIBLIOGRAFÍA

- Achachi A., B. E. Ait y M. Ibriz. 2014. "Recent Advances in Citrus Psorosis Virus." *VirusDisease* 25 (3): 261–76. doi:10.1007/s13337-014-0199-7.
- Achachi A., M. H. Jijakli, E. El Fahime, A. Soulaymani y M. Ibriz. 2015. "Detection of Citrus Psorosis Virus Using an Improved One-Step RT-PCR." *Arabian Journal for Science and Engineering* 40 (1): 7–13. doi:10.1007/s13369-014-1490-z.
- Albiach M. M. R. 2012. "Molecular Virology and Pathogenicity of Citrus Tristeza Virus." *Viral Genomes-Molecular Structure, Diversity, Gene Expression Mechanisms and Host-Virus Interactions* 14: 275–302.
- Alioto D., M. Gangemi, S. Deaglio, P. Sposato, E. Noris, E. Luisoni y R. G. Milne. 1999. "Improved Detection of Citrus Psorosis Virus Using Polyclonal and Monoclonal Antibodies." *Plant Pathology* 48 (6): 735–41. doi:10.1046/j.1365-3059.1999.00410.x.
- Almeyda L. I. H., C. M. M. Iracheta, A. J. Jasso, D. S. A. Curti, B. P. Ruíz y P. M. A. Rocha. 2002. "Reexamination of Citrus Viroids of Tahiti in." *Revista Mexicana de Fitopatología* 20 (January 2002): 152–60.
- Almeyda L. I. H., C. M. M. Iracheta, C. F. Orona, C. J. Kahlke y P. M. A. Rocha. 2003. "Extracción Simple de Ácidos Nucléicos Para La Detección de Viroides de Cítricos Mediante RT-PCR." *Revista Mexicana de Fitopatología* 21 (3): 364–69.
- Almeyda L. I. H., P. M. A. Rocha, C. M. M. Iracheta, C. F. Orona y C. J. Kahlke. 2007. "Método Simple Para La Detección Múltiple de Viroides de Cítricos." *Agrociencia* 41: 87–93.
- Alvarado G. G. O., P. M. A. Rocha, V. S. Silva, S. J. P. Martínez, R. F. Lee, B. R. Rivera y B. P. Ruíz. 2000. "Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México." In *Fifteenth IOCV Conference*, 289–93.
- Ángel J. E., E. G. Hernández, N. A. Herrera, L. Y. Gómez, Á. P. Castro, A. M. Sepúlveda y E. E. Ebratt. 2014. "Citrus Huanglongbing: Validation of Real-Time PCR ( qPCR ) for the

Detection of Candidatus Liberibacter Asiaticus and Candidatus Liberibacter Americanus in Colombia.” *Agronomia Colombiana* 32 (3): 377–89. doi:10.15446/agron.colomb.v32n3.44069.

Bar Joseph M. 2015. “Xyloporosis: A History of the Emergence and Eradication of a Citrus Viroid Disease.” *Journal of Citrus Pathology* 2 (1): 0–7.

Barbosa C. J., J. A. Pina, P. J. Pérez, L. Bernad, P. Serra, L. Navarro y V. N. Duran. 2005. “Mechanical Transmission of Citrus Viroids.” *Plant Disease* 89: 749–54.

Barbosa P. M. F., S. A. Sággio, F. Lazzari, B. H. Gomes, P. L. Vilela y A. Chalfun. 2012. “Efficiency of Rna Extraction Protocols in Different Types of Coffee Plant Tissues.” *Coffee Science, Lavras* 7 (3): 284–93.

Bar-joseph M., R. Marcus y R. F. Lee. 1989. “The Continuous Challenge of Citrus Tristeza Virus Control.” *Annual Reviews Phytopathol* 27 (106): 291–316.

Barkley P. 2008. “Citrus Exocortis.” *Primefact* 772: 1–3.

Barragán V. G., L. A. Morales, O. G. Álvarez, M. A. Peña y Z. I. Quintero. 2008. “Quantitative Diagnosis of Citrus Psorosis Virus By.” *Cultures*, no. Fawcett 1933: 225–32.

Barthe G. A., T. L. Ceccardi, K. L. Manjunath y K. S. Derrick. 1998. “Citrus Psorosis Virus: Nucleotide Sequencing of the Coat Protein Gene and Detection by Hybridization and RT-PCR.” *Journal of General Virology* 79 (6): 1531–37. doi:10.1099/0022-1317-79-6-1531.

D’Onghia A. M., F. Carimi, F. Pasquale, K. Djelouah y G. P. Martelli. 2001. “Elimination of Citrus Psorosis Virus by Somatic Embryogenesis from Stigma and Style Cultures.” *Plant Pathology* 50: 266–69.

De Francesco A., N. Costa, M. I. Plata y M. L. García. 2015. “Improved Detection of Citrus Psorosis Virus and Coat Protein-Derived Transgenes in Citrus Plants: Comparison Between RT-qPCR and TAS-ELISA.” *Journal of Phytopathology* 163 (11–12): 915–25. doi:10.1111/jph.12392.

- Duran-Vila N., J. A. Pina, J. F. Ballester, J. Juarez, C. N. Roistacher, R. Rivera-Bustamante y J. S. Semancik. 1988. "The Citrus Exocortis Disease : A Complex of Viroid-RNAs." *Tenth IOCV Conference*, 152–64.
- Eiras M., S. R. Silva, E. S. Stuchi, S. A. Carvalho y R. M. Garcêz. 2013. "Identification and Characterization of Viroids in ' Navelina ISA 315 ' Sweet Orange." *Tropical Plant Pathology* 38 (1): 58–62.
- Elleuch A., M. Marrakchi, D. Lévesque, N. Bessais, P. Perreault y H. Fakhfakh. 2003. "Molecular Variability of Citrus Exocortis Viroid in a Single Naturally Infected Citrus Tree." *Plantm Protect. Sci.* 39 (4): 139–45.
- Elleuch A., F. D. Khouaja, I. Hamdi, N. Bsais y J.P. Perreault. 2006. "Sequence Analysis of Three Citrus Viroids Infecting a Single Tunisian Citrus Tree ( Citrus , Reticulata , Clementine )." *Genetics and Molecular Biology* 29: 705–10.
- Fawcett H. y J. Klotz. 1948. "Exocortis of Trifoliolate Orange Resembles Shell Bark of Lemons and Scaly Bark of Oranges." *California Agriculture*, 13.
- Figueroa J., L. Foguet, C. A. Figueroa, C. Escobar, B. Stein y C. N. Roistacher. 2009. "Characterization of Some Psorosis and Concave Gum Isolates from Northwestern Argentina \*." *Revista Industrial Y Agrícola de Tucumán* 86 (2): 37–42.
- Garcia M. L., E. Dal Bo, O. Grau y R. G. Milne. 1994. "The Closely Related Citrus Ringspot and Citrus Psorosis Viruses Have Particles of Novel Filamentous Morphology." *Journal of General Virology* 75 (12): 3585–90.
- Garcia M. L., M. E. Sanchez De La Torre, E. Dal Bo, K. Djelouah, N. Rouag, E. Luisoni, R. G. Milne y O. Grau. 1997. "Detection of Citrus Psorosis-Ringspot Virus Using RT-PCR and DAS-ELISA." *Plant Pathology* 46 (6): 830–36. doi:10.1046/j.1365-3059.1997.d01-81.x.
- Garnsey S. M., D. Gonsalves, M. Moscovitz, D. E. Purcifull, M. F. Clark y G. Loebenstein. 1979. "The Use of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Citrus Tristeza Virus." *Phytopathology* 69 (2): 190–94.

- Guerrero G. E. C., G. O. G. Alvarado, M. H. Gutiérrez, G. R. González, O. M. G. Álvarez y R. M. Luna. 2013. “Detección Por RT-PCR Punto Final Y Tiempo Real de Tres Especies de Viroides En Cítricos de Nuevo León Y Tamaulipas , México.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 31: 20–28.
- Hajeri S., C. Ramadugu, K. Manjunath, J. Ng, R. Lee y G. Vidalakis. 2011. “In Vivo Generated Citrus Exocortis Viroid Progeny Variants Display a Range of Phenotypes with Altered Levels of Replication, Systemic Accumulation and Pathogenicity.” *Virology* 417 (2). Elsevier Inc.: 400–409. doi:10.1016/j.virol.2011.06.013.
- Hutton R. J. 2000. “Viroid Dwarfing for High Density.” *Horticultural Reviews* 24: 277–317.
- Iracheta C. M., G. L. C. Arrieta y P. M. A. Rocha. 2012. “Detección Del Virus Tristeza de Los Cítricos Mediante Anticuerpos Contra La Proteína Recombinante p25 de La Cápside Bajo Un Sistema de Inmunoimpresión.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 30 (1): 31–42.
- Iracheta M. M., C. F. Orona, L. I. H. Almeyda y P. M. A. Rocha. 2004. “Ocurrencia Y Distribución de Psorosis de Los Cítricos En El Estado de Nuevo León , México.” *Revista Mexicana de Fitopatología* 22: 299–307.
- Ito T., H. Ieki, K. Ozaki y T. Ito. 2001. “Characterization of a New Citrus Viroid Species Tentatively Termed Citrus Viroid OS.” *Archives of Virology* 146 (5): 975–82. doi:10.1007/s007050170129.
- Laino P., M. P. Russo, M. Guardo, G. R. Reforgiato y G. Valè. 2016. “Rootstock – Scion Interaction Affecting Citrus Response to CTV Infection : A Proteomic View.” *Physiologia Plantarum* 156: 444–67. doi:10.1111/ppl.12395.
- Lin C. Y., M. L. Wu, T. L. Shen, H. H. Yeh y T. H. Hung. 2015. “Multiplex Detection, Distribution, and Genetic Diversity of Hop Stunt Viroid and Citrus Exocortis Viroid Infecting Citrus in Taiwan.” *Virology Journal* 12 (11): 1–11. doi:10.1186/s12985-015-0247-y.
- Loconsole G., M. A. Castellano, M. Dell’Orco, D. Boscia y V. Savino. 2006. “Serological Detection of Citrus Psorosis Virus Using a Polyclonal Antiserum To Recombinant Virus Coat Protein.” *Journal of Plant Pathology* 88 (2): 171–77.

- Loconsole G., M. T. Fatone y V. Savino. 2009. "Specific Digoxigenin-Labelled Riboprobes for Detection of Citrus Psorosis Virus and Citrus Variegation Virus by Molecular Hybridization." *Journal of Plant Pathology* 91 (2): 311–19. doi:10.4454/jpp.v91i2.960.
- Loconsole G., M. Saponari y V. Savino. 2010. "Development of Real-Time PCR Based Assays for Simultaneous and Improved Detection of Citrus Viruses." *European Journal of Plant Pathology* 128 (2): 251–59. doi:10.1007/s10658-010-9653-6.
- Lu R., A. Folimonov, M. Shintaku, Wan-xiang Li, B. W. Falk, W. O. Dawson y Shou-wei Ding. 2004. "Three Distinct Suppressors of RNA Silencing Encoded by a 20-Kb Viral RNA Genome."
- Malfitano M., M. Barone, D. Alioto y N. Duran-Vila. 2005. "INDEXING OF VIROIDS IN CITRUS ORCHARDS OF CAMPANIA , SOUTHERN ITALY." *Journal of Plant Pathology* 87: 115–21.
- Martí S., D. Alioto, R. G. Milne, S. M. Garnsey, M. L. García, O. Grau, J. Guerri y P. Moreno. 2004. "Detection of Citrus Psorosis Virus by ELISA , Molecular Hybridization , RT-PCR and Immunosorbent Electron Microscopy and Its Association with Citrus Psorosis Disease." *European Journal of Plant Pathology* 110: 747–57.
- Martin S., D. Alioto, R. G. Milne, J. Guerri y P. Moreno. 2002. "Detection of Citrus Psorosis Virus in Field Trees by Direct Tissue Blot Immunoassay in Comparison with ELISA, Symptomatology, Biological Indexing and Cross-Protection Tests." *Plant Pathology* 51: 134–41. doi:10.1046/j.1365-3059.2002.00684.x.
- Martín S., M. L. García, A. Troisi, L. Rubio, G. Legarreta, O. Grau, D. Allio, P. Moreno y J. Guerri. 2006. "Genetic Variation of Populations of Citrus Psorosis Virus." *Journal of General Virology* 87 (10): 3097–3102. doi:10.1099/vir.0.81742-0.
- Moreno P., S. Ambrós, M. R. Albiach-Martí, J. Guerri y L. Peña. 2008. "Citrus Tristeza Virus : A Pathogen That Changed the Course of the Citrus Industry." *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY* 9: 251–68. doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.
- Murcia N., P. Serra y A. Olmos. 2009. "A Novel Hybridization Approach for Detection of Citrus

- Viroids.” *Molecular and Cellular Probes* 23 (2). Elsevier Ltd: 95–102. doi:10.1016/j.mcp.2008.12.007.
- Murcia N. y P. Serra. 2011. “Short Communication Two Nucleotide Positions in the Citrus Exocortis Viroid RNA Associated with Symptom Expression in Etrog Citron but Not in” 12: 203–8. doi:10.1111/J.1364-3703.2010.00662.X.
- Nauer E. M., C. N. Roistacher, E. C. Calavan y T. L. Carson. 1977. “The Effect of Citrus Exocortis Viroid ( CEV ) and Related Mild Citrus Viroids ( CV ) on Field Performance of Washington Navel Orange on Two Rootstocks.” *Diseases Induced by Viroids and Viroidlike Pathogens Tenth IOCV*: 204–10.
- Naum O. G., Z. S. Gago, E. Peña, O. Grau y M. L. Garcia. 2003. “Citrus Psorosis Virus RNA 1 Is of Negative Polarity and Potentially Encodes in Its Complementary Strand a 24K Protein of Unknown Function and 280K Putative RNA Dependent RNA Polymerase.” *Virus Research* 96 (1–2): 49–61. doi:10.1016/S0168-1702(03)00172-2.
- Ónelge N., A. Cinar, J. A. Szychowski, G. Vidalakis y J. S. Semancik. 2004. “Citrus Viroid II Variants Associated with ‘ Gummy Bark ’ Disease.” *European Journal of Plant Pathology* 110: 1047–52.
- Palacio B. A., X. Foissac y V. N. Duran. 1999. “Indexing of Citrus Viroids by Imprint Hybridisation.” *European Journal of Plant Pathology* 105: 897–903.
- Panno S., S. Davino, P. Tuttolomondo, G. Iacono, M. Davino, L. Rubio y L. Galipienso. 2014. “Cítricos Ornamentales Como Vector de Enfermedades: Riesgos Para El Comercio Internacional.” In *Actas de Horticultura n°68*, 25–33.
- Quiroga C. J., P. F. Hernández, H. M. R. Silva y R. J. O. Orduz. 2010. “Comportamiento de La Producción de Lima Tahití ( Citrus Latifolia Tanaka ), Injertada Sobre El Patrón de Mandarina Cleopatra ( Citrus Reticulata Blanco ) Y La Influencia Del Virus de La Tristeza ( CTV ) En Condiciones Del Piedemonte Del Meta , 1997-2008.” *Revista ORINOQUIA-Universidad de Los Llanos-Villavicencio, Meta. Colombia* 14 (1): 5–15.
- Ragozzino E., F. Faggioli y M. Barba. 2004. “Development of a One Tube-One Step RT-PCR

- Protocol for the Detection of Seven Viroids in Four Genera: Apscaviroid, Hostuviroid, Pelamoviroid and Pospiviroid.” *Journal of Virological Methods* 121 (1): 25–29. doi:10.1016/j.jviromet.2004.05.012.
- Rakowski A. G., J. A. Szychowski, Z. S. Avena y J. S. Semancik. 1994. “Nucleotide Sequence and Structural Features of the Group III Citrus Viroids.” *The Journal of General Virology* 75: 3581–84.
- Reanwarakorn K. y J. S. Semancik. 1999. “Correlation of Hop Stunt Viroid Variants to Cachexia and Xyloporosis Diseases of Citrus.” *Phytopathology* 89 (7): 568–74.
- Rivas V. P., K. E. Loeza, A. G. Mora, V. Febres, M. D. Ochoa, E. M. A. Gutierrez, W. Cintra de Jesus junior, M. C. Correira y W. N. Arno. 2008. “Estructura Poblacional de Aislamientos Del Citrus Tristeza Virus Y Su Asociación Con La Muerte Súbita de Los Cítricos En Brasil.” *Agrociencia* 42: 85–93.
- Rizza S., G. Nobile, M. Tessitori, A. Catara y E. Conte. 2009. “Real Time RT-PCR Assay for Quantitative Detection of Citrus Viroid III in Plant Tissues.” *Plant Pathology* 58: 181–85. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01941.x.
- Robles L. G., E. J. Peña, M. B. Borniego, M. Heinlein y M. L. Garcia. 2013. “Ophioviruses CPsV and MiLBVV Movement Protein Is Encoded in RNA 2 and Interacts with the Coat Protein.” *Virology* 441 (2). Elsevier: 152–61. doi:10.1016/j.virol.2013.03.019.
- Rocha P. M. A., R. F. Lee, R. Lastra, C. L. Niblett, C. F. M. Ochoa, S. M. Garnsey y R. K. Yokomi. 1995. “Citrus Tristeza Virus and Its Aphid Vector *Toxoptera Citricola*.” *Plant Disease* May 1995: 437–45.
- Roistacher C. N. 1933. “Detection of Citrus Viruses by Graft Transmission.” In *SURveys, Citrus Improvement and Other Subjects*, 175–84.
- Rosa C., M. Polek, B. W. Falk y A. Rowhani. 2007. “Improved Efficiency for Quantitative and Qualitative Indexing for Citrus Tristeza Virus and Citrus Psorosis Virus.” *Plant Disease* 91 (9): 1089–95. doi:10.1094/pdis-91-9-1089.

- Sánchez de la Torre M. E., C. López, O. Grau y M. L. García. 2002. "RNA 2 of Citrus Psorosis Virus Is of Negative Polarity and Has a Single Open Reading Frame in Its Complementary Strand." *Journal of General Virology* 83: 1777–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12075099>.
- Satyanarayana T., S. Gowda, V. P. Boyko, M. M. R. Albiach, M. Mawassi, C. Navas y A. V. Karasev. 1999. "An Engineered Closterovirus RNA Replicon and Analysis of Heterologous Terminal Sequences for Replication." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (June): 7433–38.
- Serra P., S. Gago y N. Duran-vila. 2008. "A Single Nucleotide Change in Hop Stunt Viroid Modulates Citrus Cachexia Symptoms." *Virus Research* 138: 130–34. doi:10.1016/j.virusres.2008.08.003.
- Szychowski J. A., G. Vidalakis y J. S. Semancik. 2005. "Host-Directed Processing of Citrus Exocortis Viroid." *Journal of General Virology* 86 (2): 473–77. doi:10.1099/vir.0.80699-0.
- Tessitori M., S. Rizza, A. Reina, G. Causarano y F. Serio. 2013. "Communication The Genetic Diversity of Citrus Dwarfing Viroid Populations Is Mainly Dependent on the Infected Host Species." *Journal of General Virology* 94: 687–93. doi:10.1099/vir.0.048025-0.
- Tessitori M., R. La Rosa, F. Di Serio, G. Albanese y A. Catara. 2002. "Molecular Characterization of a Citrus Viroid III ( CVd-III ) Associated with Citrus Dwarfing in Italy."
- Uc V. A., M. L. D. Ochoa, S. E. Cárdenas y A. G. Mora. 2005. "Sintomatología E Histopatología Del Amarillamiento Letal de La Lima Persa Citrus Latifolia Tanaka." *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (2): 169–75.
- Vaira A. M., M. L. Garcia, H. J. Vetten, J. A. Navarro, J. Guerri, J. Hammond y M. Verbeek. 2012. *Ophioviridae. Virus Taxonomy*. Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00060-4.
- Varveri C., A. Olmos, J. A. Pina, C. Marroqu y M. Cambra. 2015. "Biological and Molecular Characterization of a Distinct Citrus Tristeza Virus Isolate Originating from a Lemon Tree in Greece," 792–98. doi:10.1111/ppa.12308.
- Vernière C., X. Perrier, C. Dubois, A. Dubois, L. Botella, C. Chabrier, J. M. Bové y N. D. Vila.

2005. "Interactions Between Citrus Viroids Affect Symptom Expression and Field Performance of Clementine Trees Grafted on Trifoliolate Orange." *Phytopathology* 96 (4): 356–68.
- Vernière C., I. C. San, X. Perrier y C. Dubois. 2004. "Citrus Viroids : Symptom Expression and Effect on Vegetative Growth and Yield of Clementine Trees Grafted on Trifoliolate Orange." *Plant Disease* 88 (11): 1189–97.
- Vidalakis G., J. Z. Davis y J. S. Semancik. 2005. "Intra-Population Diversity between Citrus Viroid II Variants Described as Agents of Cachexia Disease." *Annals of Applied Biology* 146: 449–58.
- Vidalakis G., D. Pagliaccia, J. A. Bash, M. Afunian y J. S. Semancik. 2011. "Citrus Dwarfing Viroid : Effects on Tree Size and Scion Performance Specific to Poncirus Trifoliata Rootstock for High-Density Planting." *Annals of Applied Biology* 158: 204–17. doi:10.1111/j.1744-7348.2010.00454.x.