

# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE RAZAS SEVERAS Y DÉBILES DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

ALBERTO MENDOZA\*, CÉSAR SALAZAR\*, OMAR ALVARADO\*\*, MA. ANTONIA CRUZ\*, HUGO A. BARRERA SALDAÑA\*,\*\*\*

**E**l virus de la tristeza de los cítricos (VTC) es un patógeno de distribución mundial, y se considera uno de los cinco principales problemas sanitarios de los cítricos en el mundo. El VTC ocurre en la naturaleza en diversidad de aislamientos o razas, las cuales pueden variar en gran medida en la reacción y sintomatología en diversos hospederos, así como en su transmisión por áfidos.<sup>1</sup> Existen aislamientos del VTC que causan declinamiento y muerte en plantas de naranja, pomelo y mandarina, injertadas en el portainjerto naranjo agrio. El potencial destructivo de los aislamientos que causan acanalado o picado del tallo se considera de gran importancia económica, debido a que afectan los cítricos independientemente del portainjerto utilizado. Existen aislamientos poco patogénicos que no causan efectos visibles en los hospederos que infectan, aun en aquéllos injertados en naranjo agrio.<sup>2</sup>

El VTC es un virión filamentososo, envuelto por dos proteínas como cápside de 25 y 27 kDa.<sup>3</sup> Este virus es diseminado en la naturaleza de manera semipersistente por varias especies de áfidos, siendo el vector más eficiente *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). El virus se transmite por los vectores sin un período de latencia y tiene una pérdida de efectividad que después de 48 horas de haberlo adquirido pierde su virulencia.<sup>4,5</sup>

La mayoría de los aislamientos del VTC son poblaciones complejas integradas por mezclas de diferentes genotipos virales.<sup>6</sup> Estas mezclas incluyen

variantes genómicas, RNA defectivos (d-RNA) y genomas quiméricos que se generan como consecuencia de posibles eventos de recombinación. La recombinación se considera uno de los principales factores que determinan la evolución de los virus de RNA de cadena positiva, con sentido de la transcripción (5' a 3'), debido a que los únicos huéspedes naturales, o al menos reportados para el VTC, son precisamente los cítricos. Se ha postulado que al menos cuatro especies de progenitores de cítricos originaron las variedades actuales que se aprovechan en la agricultura y que los diferentes aislamientos del virus evolucionaron en un principio en los portainjertos de cítricos nativos de Asia, dispersándose por el mundo a través de yemas infectadas.<sup>7</sup> Estos resultados muestran que razas consideradas como débiles, por ejemplo la T-30, se encuentran ampliamente relacionadas genéticamente con aislamientos de origen asiático, así como otros más de Taiwán (B252), Colombia (B272) y California (B354), divergiendo del aislamiento T385 proveniente de España, también considerado débil. El análisis filogenético demostró que dicho ais-

\*Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro/Eliás Piña, Col. Narciso Mendoza, Cd. Reynosa, Tamps. 77810. Tel: (52-899) 924-3627. E-mail: amendoza@mail.cbg.ipn.mx  
Fax: (52-899) 925-1656.

\*\*Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Facultad de Agronomía, UANL.

\*\*\*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UANL.

lamiento (T30) se introdujo a Florida hace más de 200 años, y que sus cambios, con respecto a los aislamientos más relacionados, se deben al movimiento de los cítricos a través del mundo.<sup>1</sup>

En la actualidad, el método de detección del VTC más empleado es el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima, el cual se basa en la unión específica de un anticuerpo con un antígeno. Los anticuerpos poliespecíficos 3DF1 y el 3CA5 son capaces de detectar a la mayoría de los aislamientos conocidos de este virus.<sup>8</sup> Sin embargo, otros anticuerpos como el MCA13 son específicos para razas severas.<sup>9</sup> Los métodos previamente utilizados para diferenciar razas de VTC incluyen la reacción con distintos anticuerpos monoclonales, el análisis de mapas peptídicos de la proteína de la cápside, el análisis de RNAs bicatenarios (dsRNAs) en plantas infectadas, la hibridación molecular con sondas de DNA complementario o DNAC,<sup>10</sup> además de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Los SSCP se deben a cambios nucleotídicos en alguna(s) de las bases, debido a que el DNA (cadena sencilla) adquiere una conformación diferente de acuerdo al nucleótido presente, y los cambios en esa base permiten que el DNA migre de manera diferente; estos polimorfismos se analizan en geles de polyacrylamida en condiciones no desnaturizantes. Lee *et al.*,<sup>4</sup> encontraron que la técnica de los SSCP pudo ser empleada para diferenciar ocho aislamientos de razas débiles y agresivas, incluyendo las que causan declinamiento y picado del tallo, generando diferentes perfiles de migración de las bandas y separación de los diferentes grupos de razas, esto con base en el análisis del gen p27 que codifica para la parte complementaria de la cápside.

Lozano *et al.*<sup>11</sup> aplicaron la técnica de los RFLPs, digiriendo los productos amplificados por la RT-PCR con la enzima de restricción *Hinf* I para caracterizar la familia de los adenovirus. Estos análisis de restricción (RFLPs) fueron eficientes para caracterizar rápidamente DNA de adenovirus de fragmentos amplificados que podrían ser útiles para estudios epidemiológicos. Estudios realizados por Gillings *et al.*,<sup>12</sup> mediante el análisis del gen p25 que codifica para la cápside, previamente digerido con la enzima de restricción *Hinf* I, generaron un dendograma de similitud de diferentes aislamientos, de los cuales se conocía su caracterización biológica, para predecir si éstos pertenecían a razas débiles o seve-

ras. Esto permitió el acercamiento a una posible diferenciación de aislamientos de VTC sin tener que clonar y secuenciar el gen de la cápside.<sup>13</sup> En este estudio, el objetivo principal fue desarrollar un método molecular con base en la RT-PCR (Retro Transcripción del RNA unida a la Reacción en Cadena de la Polimerasa) para diferenciar razas del VTC, basado en la caracterización molecular del gen de la cápside o cubierta proteica del virus.

## Materiales y métodos

### Material biológico

La corteza de varetas de naranja dulce que se analizaron proceden de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. El DNAC del VTC que se utilizó como control positivo fue proporcionado por el Citrus Center de Texas A & M University.

### Extracción del RNA viral

El RNA viral se obtuvo a partir de tejidos de cítricos infectados con el método basado en el TRIzol Reagent (Gibco, BRL). Este método se aplicó en 0.1 gramo de tejido vegetal. Una vez que se extrajo el RNA se procedió a visualizarlo en gel de agarosa al 1%.

### Amplificación por RT-PCR del gen p25

Para la amplificación por la técnica de la reverso-transcripción de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) del gen p25, se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Lee *et al.*,<sup>4</sup> que amplifican un fragmento de 688 pb. Para generar el DNAC a partir del RNA viral en todas las reacciones de reverso-transcripción (RT) se aplicaron 3  $\mu$ L del extracto de RNA (2  $\mu$ g), 0.75  $\mu$ L (0.5  $\mu$ M) de los oligonucleótidos (R731-7 y RF-137 cada uno en reacciones separadas). Se incubó a 70°C por cinco minutos y después se colocó en hielo. Posteriormente, se adicionaron 5  $\mu$ L de buffer M-MLV (10X), 1.25  $\mu$ L de la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) 10 mM, 0.625  $\mu$ L de RNA y 1  $\mu$ L de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U), hasta un volumen final de 25  $\mu$ L y se incubó a 42°C por 50 min.

Una vez obtenido el DNAC viral, se procedió a amplificar en forma independiente el gen p25. Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25  $\mu$ L, con 2.5  $\mu$ L de DNAC procedente de la RT,

2.5  $\mu\text{L}$  de Buffer 10X, 1.5  $\mu\text{L}$  de cloruro de magnesio 25 mM, 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTP's 10 mM, 1.25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores 10  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{L}$  de la enzima *Taq* DNA Polimerasa (5U/ $\mu\text{L}$ ) y se completó el volumen con agua MQ estéril. Las condiciones de la amplificación fueron: un ciclo de cinco minutos a 94°C y 30 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 50°C y un minuto a 72°C. Al término de los ciclos se dio un paso de extensión final de siete minutos a 72°C. Los productos amplificados se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa 1% coloreados con bromuro de etidio (0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) e irradiados con luz ultravioleta UV.

### Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los RFLPs de los productos de PCR amplificados se determinaron con la enzima *Alu* I, de acuerdo con lo descrito por Han y New,<sup>14</sup> además de las enzimas *Hae* III y *Kpn* I. Los fragmentos generados en las reacciones anteriores se visualizaron en gel de poliacrilamida 12%.

### Clonación del gen p25

Para la clonación de los productos de PCR se utilizó el estuche comercial TA Cloning de la compañía Invitrogen (Kit PCR 2.1.), en el cual, el producto de PCR de cada una de las muestras se ligó al vector; la proporción óptima inserto-vector fue de tres moléculas del inserto por una del vector. Para la transformación, 5  $\mu\text{L}$  de cada producto de ligación se mezclaron con una alícuota de células TOP10F' ultracompetentes. Las colonias recombinantes se seleccionaron en medio Luria Bertani (LB) adicionado con ampicilina (60  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) y kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) 50  $\mu\text{L}$  X-gal (20  $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ) y 20  $\mu\text{L}$  de IPTG (100 mM). Las cajas Petri se incubaron a 37°C durante 18 h. La presencia del inserto ligado al vector se hizo por medio de una extracción de plásmidos (lisis alcalina) de las colonias transformadas seleccionadas.

### Secuencia del gen p25

Los fragmentos amplificados (p25) de cada muestra se secuenciaron mediante Sequi Therm Excel II DNA Sequencing en el secuenciador DNA Analyzer (LI-COR Inc. Nebraska, USA). Las secuencias nucleotídicas de cada uno de los aislamientos en es-

tudio se analizaron en el banco de genes (Gen Bank, www.ncbi.nlm.nih.gov) mediante el programa computacional Blast. Los alineamientos múltiples de las secuencias del VTC obtenidas se realizaron mediante el programa Clustal X,<sup>15</sup> con lo cual se procedió a realizar el dendograma de similitud, con el programa Protdist del conjunto de programas Phylip.<sup>16</sup>

## Resultados y discusión

Los aislamientos del VTC de huertos cítricos comerciales del noreste de México se caracterizaron aplicando técnicas moleculares. La detección del VTC a nivel mundial se realiza principalmente en forma inmunológica, usando anticuerpos contra la proteína de la capa proteica (cápside) del virus.<sup>8,9</sup> Sin embargo, las técnicas de inmunopresión y PCR actualmente han tomado mucho auge, sobre todo esta última. De ahí que una de nuestras principales metas haya sido amplificar el gen de la cápside a partir de las muestras de trabajo.

### Amplificación del gen p25 que codifica para la cápside

En la figura 1 se muestran los fragmentos amplificados a partir de las reacciones de reverso-transcripción, con un tamaño de 688 pb y correspondiendo al gen de la cápside. En los carriles NL2, T2 y V2 se aprecia que se amplificaron algunos fragmentos inespecíficos, por lo que se decidió purificar el producto de interés. El fragmento de 688 pb de la muestra H33 (último carril), que pertenece a una raza severa, sirvió de referencia para las comparaciones.

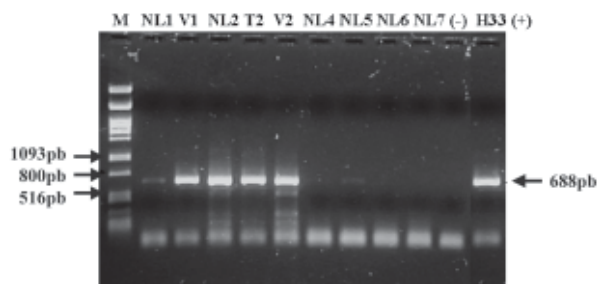


Fig. 1. Amplificación del gen p25 del VTC. Cada carril corresponde a una muestra de los aislamientos de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1%. El gen p25 corresponde al fragmento de 688 pb.

En una de las muestras (NL1) el rendimiento de la amplificación fue débil, a pesar de haber intentado incrementar la concentración del RNA total extraído de los tejidos para modificar varias condiciones de la reacción, como la temperatura de alineamiento, la cantidad del DNAC y concentración del cloruro de magnesio. En dicha muestra, la amplificación fue pobre debido a que, probablemente, la concentración del virus en el tejido era muy baja y la integridad de éste no era la óptima, afectando la cantidad del RNA. Bar-Joseph *et al.*,<sup>17</sup> mostraron que las bajas concentraciones del RNA viral provocan una amplificación deficiente.

### Análisis de RFLPs mediante el uso de las endonucleasas de restricción *Alu I*, *Hae III* y *Kpn I*

Los RFLPs de los productos amplificados correspondientes al gen de la cápside se digirieron con la enzima de restricción *Alu I*. En los perfiles generados se pudo constatar que los aislamientos de Nuevo León y Veracruz (NL1, NL2 y V1) son muy similares, sin embargo, no se detectó algún patrón definido que permitiera diferenciar los aislamientos. Una vez realizados los RFLPs con la enzima *Alu I*, se procedió a inferir un dendrograma empleando diferentes programas computacionales (EMBOSS, Cross Checker y TreeView) para observar el agrupamiento de los aislamientos con base en el patrón de bandas. Aun así, el dendrograma no evidenció relación entre los aislamientos del VTC; por un lado agrupa aislamientos de una misma región, NL2 y NL1; y por otro, los aislamientos V1 y T2, aunque entre éstos existe una alta similitud, lo cual nos indica que estos aislamientos forman patrones similares (pero no idénticos) entre éstos. Casualmente, estos aislamientos se habían catalogado como posibles razas débiles. Sin embargo, habría que señalar que el aislamiento H33, que pertenece a una raza severa, se agrupa con el aislamiento V2 y se clasifica como raza débil. Aunque un número mayor de aislamientos del VTC serían necesarios para darle más solidez a estas observaciones, todo indica que los perfiles generados con esta enzima, *Alu I*, no permitirían una distinción confiable entre las razas débiles y las severas.

Afortunadamente, la aplicación de las enzimas de restricción *Hae III* y *Kpn I*, para caracterizar las razas del VTC, sí fue útil en nuestro caso, ya que nos permitió separar las razas severas de las débiles a partir de variaciones nucleotídicas del gen p25,

que codifica para la proteína de la cápside. Con este conjunto de secuencias se hizo un mapa de restricción para cada una de éstas con el programa DNA Straider,<sup>18</sup> que incluyó más de 20 enzimas de restricción diferentes. Este análisis mostró que las razas de VTC pertenecientes a razas débiles no presentaron los sitios de restricción de *Hae III* y *Kpn I*. Por otro lado, las razas severas que producen declinamiento sí tienen conservado sólo el sitio *Hae III*, pero carecen del sitio *Kpn I*. Algo muy interesante es que las razas de virus que producen picado de tallo presentan tanto los sitios *Hae III* como *Kpn I*, a excepción de una secuencia que sólo presentó el sitio *Kpn I*, aunque habría que aclarar que no se tiene la certeza de la caracterización biológica de este aislamiento.

Los análisis de los aislamientos NL1, V1 y NL2, que forman un mismo grupo con el testigo positivo H33, revelaron únicamente el sitio de corte *Hae III* en la posición nucleotídica 516. Por su parte, los aislamientos T2 y V2 formaron otro grupo al no presentar el sitio de corte para esta enzima (figura 2). Posteriormente, a los aislamientos que presentaron el sitio *Hae III* se les realizó una segunda digestión con la enzima de restricción *Kpn I*, la cual está presente (nucleótido 149) en las razas que provocan tanto declinamiento como picado de tallo y en los cuales hubo un solo grupo junto con el testigo positivo H33. Estas enzimas presentaron un sitio de res-

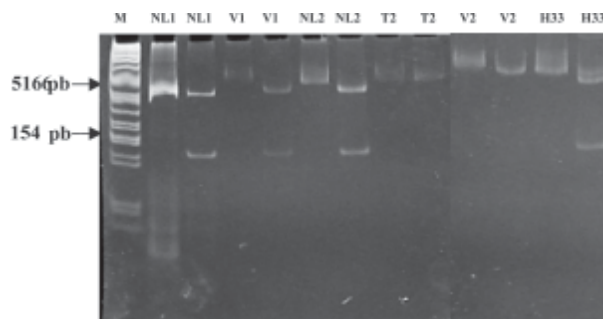


Fig. 2. Perfil de RFLP del gen p25 con la enzima *Hae III*. Carril 1: M = Fago  $\lambda$  digerido con *Pst I*; 2: Fragmento de PCR de NL1 sin digerir; 3: Fragmento de PCR de NL1 digerido; 4: Fragmento de PCR de V1 sin digerir; 5: Fragmento de PCR de V1 digerido; 6: Fragmento de PCR de NL2 sin digerir; 7: Fragmento de PCR de NL2 digerido; 8: Fragmento de PCR de T2 sin digerir; 9: Fragmento de PCR de T2 digerido; 10: Fragmento de PCR de V2 sin digerir; 11: Fragmento de PCR de V2 digerido; 12: Fragmento de PCR de H33 sin digerir; 13: Fragmento de PCR de H33 digerido.

tricción en las secuencias de las razas severas. Gillings *et al.*,<sup>12</sup> encontraron que mediante los RFLPs generados al digerir el gen p25 (cápside) con la enzima de restricción *Hinf* I, produjeron la mejor discriminación entre razas del VTC definiendo siete grupos, donde algunos de éstos englobaban los aislamientos con características biológicas similares. En nuestro caso, la enzima *Hae* III fue útil para discriminar las razas débiles de las severas, ya que genera un solo patrón y fácilmente se pueden distinguir unas de otras. Mientras que la enzima *Kpn* I separa dentro de las razas severas a las que producen declinamiento de las que inducen picado de tallo. Consideramos que el protocolo desarrollado en este trabajo ofrece ventajas sobre los previamente reportados, porque un corte con la enzima basta para discriminar las razas débiles de las severas y otro más para las que producen declinamiento de las que inducen picado de tallo. Por ejemplo, un método que se ha publicado para diferenciar o separar las razas débiles de las severas se basa en la aplicación de anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de partículas virales de razas débiles o severas, haciendo un análisis tipo ELISA.<sup>10</sup> Sin embargo, este método ha sido rechazado por las nuevas tecnologías moleculares. Por tal razón, consideramos que nuestro método es más sencillo y menos costoso.

**Análisis de las secuencias del gen p25 (cápside)**

Para el gen p25 (cápside) se lograron obtener cin-

co secuencias nucleotídicas completas de las clonas correspondientes a los aislamientos NL1, V1, NL2, V2 T2. Estas secuencias se compararon en el banco de genes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para asegurar que correspondieran al gen p25 del VTC. Una vez confirmada su identidad, se procedió a traducirlas en aminoácidos mediante el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias de aminoácidos de los aislamientos se compararon con el programa BLAST para determinar similitudes entre sí, encontrándose similitudes cercanas al 80%. Pappu *et al.*,<sup>19</sup> obtuvieron resultados similares al analizar la relación entre la severidad de diferentes aislamientos del VTC y las similitudes entre las secuencias de su gen de la cápside. Ellos refieren similitudes de hasta 80% entre las secuencias de aminoácidos de los once aislamientos analizados, lo cual concuerda con los porcentajes aquí reportados entre las secuencias obtenidas de los aislamientos del VTC.

Los aislamientos CBG-NL1, CBG-NL2 y CBG-V1 mostraron un 96% de similitud respecto a razas que ocasionan picado del tallo y declinamiento, mientras que el aislamiento CBG-V2 presentó un 99% de identidad con la cepa T30 clasificada como débil.

Estos análisis mostraron diferencias entre secuencias y, por lo tanto, se podría pensar que se trataba de infecciones independientes o de razas diferentes, pero, sobre todo, hay que señalar un par de cambios interesantes: en la figura 3 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias, donde el

Fig. 3. Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de cinco aislamientos de Nuevo León, Veracruz y Tamaulipas. Los asteriscos (\*) indican aminoácidos idénticos; (;) indica grupos de aminoácidos fuertemente conservados; (.) indica grupos de aminoácidos débilmente conservados. Los residuos 49 y 63 se resaltan con negritas. Se indica el sitio de corte con *Hae* III = H y el sitio de corte con *Kpn* I=K.





aislamiento CBG-V2 presenta una serina (S) en el residuo 49, mientras que los otros tres aislamientos poseen una glicina (G). Asimismo, en el residuo 63, el aislamiento CBG-V2 presenta una alanina (A), mientras que en los otros aislamientos se conserva una treonina (T).

Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias antes mencionadas con las ya reportadas y tomadas como referencia. En este análisis de la secuencias del gen de la cápside se encontró que en la razas severas, los residuos 49, 63 y 124 se encuentran conservados en: una glicina (G), una treonina (T) y una fenilalanina, respectivamente; mientras que en las razas consideradas débiles se reemplazan por una serina (S), una alanina (A) y una tirosina (Y), respectivamente (figura 4). Los dos primeros cambios no han sido reportados en la literatura, sin embargo, Pappu *et al.*,<sup>19</sup> en 1993, describieron que las razas severas tienen conservado el aminoácido fenilalanina (F), mientras que las

razas débiles tienen conservado el aminoácido tirosina (Y) en la misma posición, y éste es el único cambio distintivo entre las razas severas y débiles anteriormente reportado. Creemos que estos residuos podrían jugar un papel muy importante en la patogenicidad del VTC, mismo que valdría la pena estudiar más adelante.

Cabe señalar que los aislamientos CBG-V2 y CBG-T2 no presentan los sitios *Hae* III y *Kpn* I, al igual que los reportados como razas débiles. Sin embargo, las razas severas que ocasionan declinamiento, como la T36, presentan únicamente el sitio *Hae* III, y las severas que ocasionan picado de tallo, como SY568, presentan los sitios *Hae* III y *Kpn* I, junto con CBG-NL1, CBG-NL2 y CBG-V1. El cambio que se presenta en la secuencia nucleotídica de la cápside, a raíz de la presencia del sitio *Kpn* I, es en la tercera posición de un codón de treonina, por lo tanto, el cambio es a nivel nucleotídico y no a nivel aminoacídico. Asimismo, la enzima *Hae* III tam-

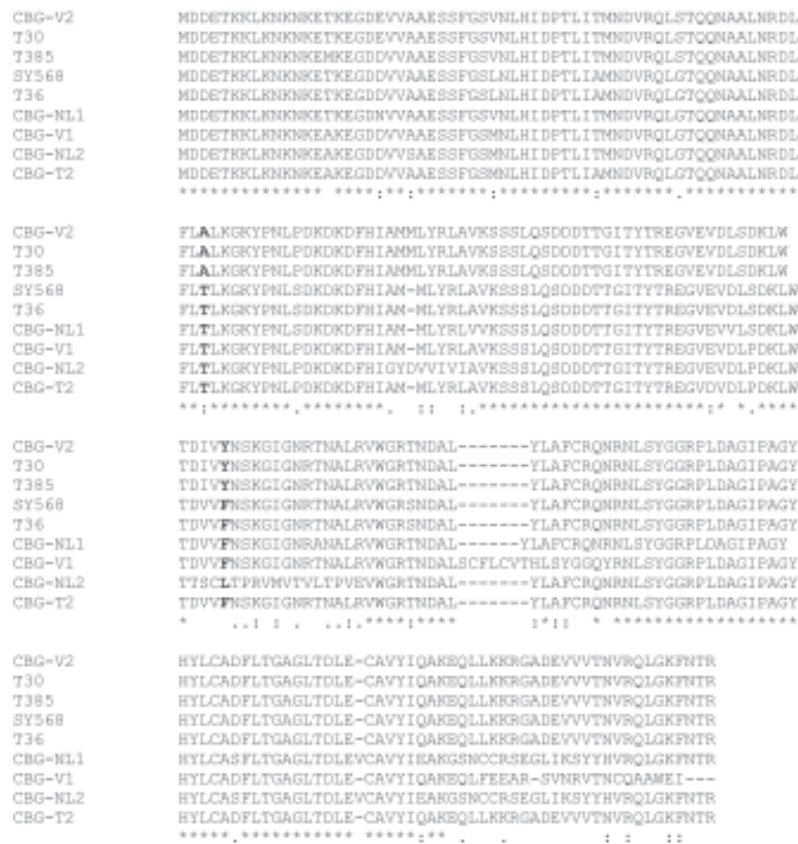


Fig. 4. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos del gen p25. Los asteriscos (\*) indican aminoácidos idénticos; (:) indica grupos de aminoácidos fuertemente conservados; (;) indica grupos de aminoácidos débilmente conservados. Los residuos distintivos 49, 63 y 124, glicina (G), treonina (T) y fenilalanina (F), los cuales se encuentran conservados en razas consideradas como severas.

bién corta en la tercera posición de un codón de alanina, siendo el cambio también silencioso.

A partir del alineamiento múltiple de nuestras secuencias, junto con las ya reportadas y caracterizadas biológicamente por Pappu *et al.*:<sup>19</sup> T36 (declinamiento), SY568 (picado de tallo), T30 y T385 (débiles) se procedió a realizar el dendrograma de similitud y, al mismo tiempo, para obtener las distancias entre las secuencias de aminoácidos se aplicó el programa Protdist del paquete Phylip; a partir del cual se observó que los aislamientos CBG-NL1, CBG-NL2, CBG-V1 y CBG-T2 formaron un mismo grupo muy cercano a las razas severas T36 y SY568 (todas presentan los sitios *Hae* III y *Kpn* I); el aislamiento CBG-V2, por su parte, formó otro grupo con la raza débil T30. Ahora bien, los aislamientos CBG-V2 y T30 se relacionaron con una distancia genética de 0, al igual que el otro grupo conformado por SY568 y T36. El aislamiento que presenta una mayor distancia con respecto a los demás fue el aislamiento CBG-T2 donde la distancias observadas fueron entre 1.4 y 1.6 con respecto a los otros aislamientos del VTC (figura 5).

Con base en lo anterior, consideramos que la técnica de los RFLPS con las enzimas de restricción *Hae* III y *Kpn* I del gen de la cápside tienen potencial para diferenciar las razas débiles de las severas, dado que es más sencillo y práctico hacer una digestión enzimática del DNA que realizar hibridaciones. Por lo tanto, esta técnica sería potencialmente más rápida y confiable para discriminar los tipos de razas de VTC, siempre y cuando se aumente el número de secuencias analizadas y que se cuente con su caracterización biológica.

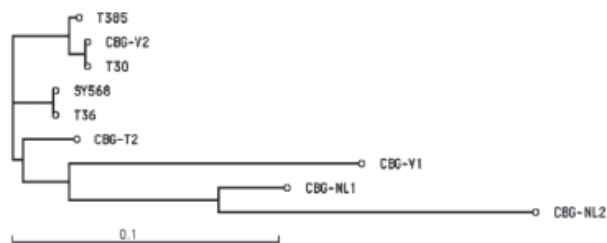


Fig. 5. Dendrograma de similitud de los diferentes aislamientos del VTC, mediante análisis computacional de las secuencias aminoácidas del gen que codifica para la cápside. Los aislamientos de referencia son el T36 (severo, declinamiento); SY568 (severo, picado de tallo); T30 (débil) y T385 (débil).

## Conclusiones

1.- El dendrograma de similitud, generado por los RFLP del gen de la cápside mediante la digestión con la enzima *Alu* I, no permitió agrupar o diferenciar los aislamientos del VTC de acuerdo con su perfil electroforético comparado con una raza severa.

2.- El análisis de las secuencias del gen de la cápside mostró que las razas severas tienen el sitio *Hae* III, y, dentro de éstas, utilizando la enzima *Kpn* I se logró separar las que causan picado de tallo de aquellas que causan declinamiento.

3.- Los dendrogramas de similitud generados a partir de las secuencias de aminoácidos del gen de la cápside permitieron separar las razas severas de las débiles. Del total de muestras analizadas, los aislamientos CBG-NL1, CBG-NL2 y CBG-V1 podrían ser considerados como razas severas y los dos restantes, CBG-T2 y CBG-V2, como posibles razas débiles.

4.- Se encontraron tres aminoácidos conservados: el residuo 49 (glicina), el residuo 63 (treonina) y el residuo 124 (fenilalanina) que pudieran estar involucrados en la patogenicidad del VTC.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de este trabajo por parte del Sireyes-Conacyt (Proyecto 20000601009), así como a la CGPI-Instituto Politécnico Nacional. Además, a la Sagarpa por facilitarnos las muestras de tejido infectado y a Maurilio González Paz, por su valiosa ayuda con el paquete computacional Phylip.

## Resumen

La tristeza de los cítricos es la enfermedad viral más importante de éstos a nivel mundial; debido a que en los últimos 20 años ha causado la muerte a más de 100 millones de árboles en América del Sur, California, Florida (EE.UU.), Israel y España. El *Citrus tristeza closterovirus* (Virus de la tristeza de los cítricos o VTC) se transmite principalmente por el áfido *Toxoptera citricida* y por material vegetativo infectado (injertos). El áfido *T. citricida* ha sido recientemente detectado en el sureste de nuestro país. La presencia del virus y del áfido en el territorio mexicano es relevante porque la mayoría de las plantas comerciales (más del 90%) están injertadas sobre

naranja agrio que es susceptible al VTC, por lo que se podría ocasionar una epidemia. La caracterización molecular de diferentes razas, la cual incluye la secuenciación completa del genoma del VTC, ha abierto la puerta para hacer diversos estudios encaminados a contrarrestar (disminuir) los daños causados por este complejo viral. Por lo anterior, este trabajo de investigación tuvo como objetivo desarrollar un método para diferenciar razas del VTC, basado en la caracterización molecular del genoma viral. Para lograrlo se amplificó la secuencia del gen de la cápside, posteriormente se buscaron polimorfismos con enzimas de restricción que permitieran diferenciar razas débiles de severas. Los resultados mostraron que al realizar los RFLPs empleando la enzima *Hae* III se lograron diferenciar las razas débiles de las severas. De igual forma, el uso de la enzima *Kpn* I discriminó las razas que ocasionan picado de tallo de las que inducen el declinamiento. Los dendrogramas derivados del alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos mostraron la separación de las razas débiles de las severas. El análisis de la secuencia nucleotídica del gen p25 en las posiciones 49, 63 y 124 mostró a los aminoácidos glicina, treonina y fenilalanina presentes en las razas severas.

**Palabras clave:** VTC, Raza débil, Raza severa, Picado del tallo, Declinamiento.

## Abstract

The *Citrus Tristeza closterovirus* (CTV) is the most important viral disease of the citrus trees in the world, infecting more than 100 million trees in the past 20 years in South America, U.S.A, Israel and Spain. The CTV is transmitted by the aphid *Toxoptera citricida* and by infected vegetative material. The most visible effects caused by the CTV are a fast decline and death of trees grafted onto rootstocks (*Citrus aurantium* L). The presence of the virus and the aphid in the Mexican territory constitutes a real hazard considering that most of the commercial plants (> 90%) are grafted on *C. aurantium*, which is susceptible to CTV, thus creating the possibility of an epidemic. The detection of VTC has been mainly achieved by serology, and lately by molecular methods. The molecular characterization of different races, including the complete genome sequence of the CTV, has allowed progress in obtaining transgenic citric cultivars resistant to this virus. This

study was aimed at developing a method for the differentiation of races of the CTV, based on the molecular characterization of the viral genome. In doing so, we amplified the coat protein gene. Afterward, we examined its polymorphisms with restriction enzymes that allowed differentiation between weak and severe races. Our results show that using the enzyme *Hae* III in PCR products of the gene p25, it was possible to relate its genetic profiles to the different CTV races. The use of *Hae* III allowed us to distinguish the weak races (CBG-T2, CBG-V2) from the severe ones (CBG-NL1, CBG-NL2, CBG-V1, H33). Furthermore, the enzyme *Kpn* I allowed differentiating between races that cause stem pitting and those inducing decline. The analysis of the P25 gene sequence in positions 49, 63, and 124 demonstrated the presence of the amino acids glycine, threonine, and phenylalanine in severe races. These amino acids could be involved in the pathogenicity of the CTV.

**Keywords:** CTV, Weak races, Severe races, Stem pitting, Decline.

## Referencias

1. Roistacher C N, P Moreno (1991). The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus – A review. pp 7-19. In: Proc. 11th. Conf. of the Inter. Organ. Citrus Virol. Riverside, California.
2. Lee R. F., M. A. Rocha Peña (1992). Citrus Tristeza Virus. pp. 226-249, In: Mukhapadhyay, A. N., Chaube, H. S., Kumar, J. and Singh, U. S. (eds). Plant Diseases of International Importance III. Prentice Hall. New Jersey.
3. Febres V J, L Ashoulin, M Mawassi, A Frank, M Bar-Joseph, KL Manjunath, R. F. Lee, C. L. Niblett, (1996). The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335.
4. Lee R F, H R Pappu, M A Rocha-Peña, V J Febres, K L Manjunath, O V Nikolaeva, A V Karasev, B Cevik, M Akbulut, D Benscher, E J Anderson, M Price, F Ochoa, C L Niblett (1996) Progress on Strain Differentiation of Citrus Tristeza Virus. *Revista Mexicana de Fitopatología* 14: 79-87.
5. Rocha-Peña M A, R F Lee, R Lastra, C N Niblett, F M Ochoa-Corona, S M Garnsey, R K Yokomi (1995). Citrus tristeza virus and its aphid vector, *Toxoptera citricida*. *Plant Disease*. 79:437-445.



6. Ayllón, M. A., L. Rubio, A. Moya, J. Guerri, P. Moreno (1999). The haplotype distribution of two genes of citrus tristeza virus is altered after host change or aphid transmission. *Virology* 25:32-9.
7. Albiach-Martí, M. R., M. Mawassi, S. Gowda, T. Satyanarayana, M. Hilf, S. Shanker, E. C. Almira, M. C. Vives, C. López, J. Guerri, R. Flores, P. Moreno, S. M. Garnsey, W. O. Dawson (2000) Sequences of Citrus Tristeza Virus Separated in Time and Space are Essentially Identical. *Journal of Virology* 74: 6856-6865.
8. Vela C., M. Cambra, E. Cortés, P. Moreno, J. G. Miguel, C. Pérez de San Román, A. Sanz (1986). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for citrus tristeza virus and their use in diagnosis. *Journal of General Virology*. 67:91-96.
9. Permar T. A., S. M. Garnsey, D. J. Gumpf, R. F. Lee (1990). A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.
10. Moreno P. J., Guerri, J. P. Aguilar, M. R. Albiach-Martí, L. Rubio, M. A. Ayllón (1996). Caracterización de razas del virus de la tristeza de los cítricos mediante hibridación molecular y su aplicación al control de la enfermedad. Estudio preliminar del genoma del virus. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA). pp. 207-216.
11. Lozano M. E., D. M. Posik, C. G. Albariño, G. Schujman, P. D. Ghiringhelli, G. Calderón, M. Sabattini, V. Romanowski (1997). Characterization of arenoviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis its potential use for detection of uncharacterized arenoviruses. *Virus Research* 49: 79-89.
12. Gillings M., P. Broadbent, J. Indsto, R. Lee (1993). Characterization of isolates of citrus tristeza closterovirus using restriction analysis of the coat protein gene amplified by the polymerase chain reaction. *Journal of Virology. Methods* 44: 305-317.
13. Cepeda-Nieto, A. C., and Barrera Saldaña, H. A. 1997. *Cloning and sequencing of the coat protein gene of a new isolate of citrus tristeza virus from Mexico*. *Plant Disease* 81: 693.
14. Han S. O., P. B. New (1998). Variation in Nitrogen Fixing Ability among Natural Isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecology* 36: 193-201.
15. Thompson J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, D. G. Higgins (1997). The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Versión 1.8. *Nucleic Acids Research*. 24:4876-4882.
16. Felsenstein J. (1993). *Phylip (Phylogeny Inference Package)*. Versión 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
17. Bar-Joseph, M., S. M. Garnsey, D. Gonsalves, D. E. Purcifull (1980). Detection of citrus tristeza virus. 1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and SDS-immunodiffusion methods. *In Proc. 8th Conf: IOCV*, p. 1-8. Riverside, Univ. Calif.
18. Marck, Ch. (1989). A C program for DNA and Protein analysis. Service de Biochimie, Département de biologie, Institute de Recherche Fundamentale CEA. France.
19. Pappu H., S. Pappu, C. Niblett, R. Lee, E. Civerolo (1993). Comparative Sequence Analysis of the Coat Proteins of Biologically Distinct Citrus Tristeza Closterovirus Isolates. *Virus Genes* 7: 255-264.