

## DIFERENCIACIÓN MOLECULAR DE RAZAS SEVERAS Y DÉBILES DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS EN MÉXICO

### MOLECULAR DIFFERENTIATION OF WEAK AND SEVERE CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES IN MÉXICO

Alberto Mendoza\*, César Salazar, Omar Alvarado y Ma. Antonia Cruz y Hugo Barrera

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Blvd. del Maestro/Elias Piña, Col. Narciso Mendoza, C.P. 77810. Cd. Reynosa, Tam. Tel. 01 (899) 924-3627. Fax: 01 (899) 925-1656. Correo electrónico: amendoza@mail.cbg.ipn.mx

\* Autor responsable

#### RESUMEN

La tristeza de los cítricos es la enfermedad viral más importante de los cítricos a nivel mundial, debido a que en los últimos 20 años ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles en América del Sur, Estados Unidos, Israel y España. El Citrus Tristeza Closterovirus (Virus de la Tristeza de los Cítricos, 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 México. La presencia del virus y del áfido en el territorio mexicano es relevante, ya que la mayoría de las plantas comerciales (> 90 %) están injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) 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 los daños causados por este complejo viral. 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 mediante la enzima *Hae* III se lograron diferenciar las razas débiles (CBG-T2, CBG-V2) de las severas (CBG-NL1, CBG-NL2, CBG-VI, H33). 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 dendogramas 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 y treonina y fenilalanina presentes en las razas severas, que parecen involucrados en la patogenicidad del VTC.

**Palabras clave:** VTC, raza débil, raza severa, picado del tallo, declinamiento

#### SUMMARY

The Citrus Tristeza Closterovirus (CTV) is the more important viral disease of citrus trees in the world. Over 100 million trees were lost 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 presence of the virus and the aphid in the Mexican territory constitute a real menace, since most of the commercial plants (> 90 %) are grafted on *C. aurantium* which is susceptible to CTV, so there could be an epidemic. The molecular

characterization of different races, including the complete genome sequence of the CTV, has allowed progresses in obtaining transgenic citric cultivars resistant to this virus. This study was aimed to develop an method for the differentiation of CTV races, based on the molecular characterization of the viral genome. For that purpose we amplified the coat protein gene, and we examined its polymorphisms with restriction enzymes that might allow differentiation between weak and severe races. Our results show that using the enzyme *Hae* III in PCR products of the gene p25, was possible to relate its genetic profiles to the different CTV races. The use of *Hae* III allowed to distinguish the weak (CBG-T2, CBG-V2) from the severe (CBG-NL1, CBG-NL2, CBG-VI, H33) races. Furthermore, the enzyme *Kpn* I allowed to differentiate those races causing stem pitting from those inducing decline. The analysis of the sequence of the gene p25 showed three possible amino acids (glycine, threonine and phenylalanine) in positions 49 and 63 and 124, respectively, that could be involved in the pathogenicity of the CTV, since they are conserved in the severe races.

**Index words:** CTV, weak race, severe race, stem pitting, tree decline.

#### INTRODUCCIÓN

El virus de la tristeza de los cítricos (VTC) es un patógeno de distribución mundial, y se le 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 ampliamente en la reacción y sintomatología en diversos hospederos, así como en su transmisión por áfidos (Roistacher y Moreno, 1991). Existen aislamientos del VTC que causan declinamiento y muerte en plantas de naranjo (*Citrus sinensis* L. Osb.), pomelo (*Citrus maxima*) y mandarina (*Citrus rehni*), injertadas en el portainjerto naranjo agrio (*Citrus aurantium*). El potencial destructivo de los aislamientos que causan acanalado o picado del tallo se consideran de importancia económica, debido a que éstos afectan a los cítricos independientemente del portainjerto utilizado. Existen aislamientos poco patogénicos que no causan efectos visibles en los hospederos que infectan, aún en aquellos injertados en naranjo agrio (Lee y Rocha-Peña, 1992).

El VTC es un virión filamentosos, envuelto por dos proteínas como cápside de 25 y 27 kDa (Febres *et al.*, 1996). Este virus es diseminado en la naturaleza de manera semi-persistente por varias especies de áfidos, principalmente por *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). El virus se transmite por los vectores sin un periodo de latencia y tiene una pérdida de efectividad; después de 48 horas de haberlo adquirido pierde su virulencia (Lee *et al.*, 1996; Rocha-Peña *et al.*, 1995).

La mayoría de los aislamientos del VTC son poblaciones complejas integradas por mezclas de diferentes genotipos virales (Ayllón *et al.*, 1999). Esta mezcla incluye 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 el único huésped natural o al menos reportado para el VTC, son precisamente los cítricos. Se postula que al menos cuatro especies de progenitores de cítricos originaron las variedades actuales que se usan en la agricultura y que los diferentes aislamientos del virus evolucionaron en un principio en los portainjertos de cítricos nativos de Asia, que se dispersaron alrededor del mundo a través de yemas infectadas (Albiach-Martí *et al.*, 2000). Estos resultados muestran que razas consideradas como débiles, por ejemplo la raza T-30, se encuentran ampliamente relacionadas genéticamente con aislamientos de origen asiático, así como otros más de Taiwán (B252), Colombia (B272) y California (B354), pero divergen del aislamiento T385 proveniente de España también considerado débil. El análisis filogenético demostró que dicho aislamiento (T30) fue introducido a Florida hace más de 200 años y que sus cambios con respecto a los aislamientos más relacionados, son debidos al movimiento de los cítricos a través del mundo (Roistacher y Moreno, 1991).

En la actualidad el método de detección del VTC más utilizado 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 3DF1y el 3CA5 son capaces de detectar a la mayoría de los aislamientos conocidos de este virus (Vela *et al.*, 1986); otros anticuerpos como el MCA13 son específicos para razas severas (Permar *et al.*, 1990). 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 (Moreno *et al.*, 1996); además de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP) y polimorfis-

mos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs). Los SSCP o polimorfismos en la conformación de cadena sencilla se deben a cambios nucleotídicos en alguna(s) de las bases, debido a que el DNA (cadena sencilla) adquiere una conformación diferente, de acuerdo con los cambios en algún nucleótido presente; si esto resulta en un cambio estructural del DNA entonces éste migra de manera diferente; estos polimorfismos se analizan en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Lee *et al.* (1996) encontraron que la técnica de los SSCP pudo ser empleada para diferenciar ocho aislamientos de razas débiles y agresivas que incluyen las que causan declinamiento y picado del tallo, pues generan diferentes perfiles de migración de las bandas y separación de los diferentes grupos de razas, con base en el análisis del gen p27 que codifica para la parte complementaria de la cápside.

Lozano *et al.* (1997) utilizaron la técnica de los RFLPs al digerir 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.* (1993) mediante el análisis del gen p25 que codifica para la cápside, previamente digerido con la enzima de restricción *Hinf* 1, generó un dendograma de similitud de diferentes aislamientos, de los cuales se conocía su caracterización biológica, para predecir si éstos pertenecían a razas débiles o severas. Esto permitió el acercamiento a una posible diferenciación de aislamientos de VTC, sin tener que clonar y secuenciar el gen de la cápside (Cepeda-Nieto, 1997).

Con base en esos resultados se hizo la comparación de los mismos para buscar nuevas alternativas que proporcionen métodos moleculares más sencillos, no sólo para detectar al VTC, sino además para poder diferenciar razas débiles de las severas, por lo que este trabajo de investigación se enfocó a desarrollar un método molecular para la diferenciación de razas del VTC, basado en la caracterización molecular del genoma viral. Conviene mencionar que la cápside de este virus ha sido ampliamente relacionada con la virulencia o severidad del mismo, por ser la parte que tiene el primer contacto con la planta hospedera (Gillings *et al.*, 1993).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se recolectó corteza de varetas de naranjo dulce (*Citrus sinencis* L. Osb.) procedentes de los estados de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. El DNAC que se utilizó

como control positivo fue proporcionado amablemente por el Citrus Center de Texas A & M University en Kingsville, Texas, EE.UU.

### Extracción del RNA viral

El RNA viral se obtuvo a partir de tejidos de cítricos infectados con VTC, con el método de extracción de ácido ribonucleico total basado en el TRIzol Reagent (Gibco, BRL). Este método se aplicó en 0.1 g de tejido vegetal con 1 mL de reactivo TRIzol. Una vez que se extrajo el RNA, se procedió a visualizarlo en gel de agarosa 1%, conforme a la técnica descrita por Goda y Minton (1995).

### 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 que codifica para la cápside del VTC, se utilizaron los oligonucleótidos descritos por Lee *et al.* (1996), que amplifican un fragmento de 688 pb. Las secuencias de los oligonucleótidos son: en sentido R731-7 5'-cgg aac gca aca gat caa cg-3', y en antisentido R731-6 5'-att atg gac gaa aca aa-3'.

Para generar el DNAC a partir del RNA viral, en todas las reacciones de reverso-transcripción (RT) se utilizaron 3 µL del extracto de RNA (2 µg), 0.75 µL (0.5 µM) de los oligonucleótidos (R731-7 y RF-137, cada uno en reacciones separadas), con adición de agua MQ estéril para un volumen final de 15 µL. Esta mezcla se incubó a 70 °C por 5 min y después se colocó en hielo. Posteriormente, se adicionaron 5 µL de buffer M-MLV (1X), 1.25 µL de la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTPs) 0.5 mM, 0.625 µL de RNA y 1 µL de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (200 U), hasta un volumen final de 25 µL. Esta reacción se mezcló suavemente y se incubó a 42 °C durante 50 min. Una vez obtenido el DNAC viral se procedió a amplificar en forma independiente el gen p25 que codifica para la cápside por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen final de 25 µL, con 2.5 µL de DNAC procedente de la RT, 2.5 µL de Buffer 10X, 1.5 µL de cloruro de magnesio 25 mM, 0.5 µL de dNTPs 10 µM, 1.25 µL de cada uno de los iniciadores 10 µM, 0.25 µL de la enzima *Taq* DNA polimerasa (1.25 U) y se completó el volumen con agua MQ estéril. El programa que se utilizó consistió de un ciclo de 5 min a 94 °C y 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 1 min a 72 °C. Al término de los ciclos se dio un paso de extensión final de 7 min a 72 °C. Las reacciones de RT-PCR se llevaron a cabo en un termociclador GeneAmp modelo 9700 de la compañía Perkin Elmer (Norwalk, Connecticut, EE. UU). Los productos amplificados fueron resueltos por electroforesis

en geles de agarosa 1 % coloreados con bromuro de etidio (2 mg mL<sup>-1</sup>) e irradiados con luz ultravioleta UV.

### Análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs)

Los RFLPs de los productos de PCR amplificados se determinaron mediante la enzima de restricción *Alu* I que reconoce la secuencia AGCT, de acuerdo con lo descrito por Han y New (1998). También se utilizaron las enzimas de restricción *Hae* III y *Kpn* I que reconocen las secuencias GG/CC y GGTAC/C, respectivamente. Las reacciones se llevaron a cabo con 500 ng de DNA, dos unidades de la enzima en cuestión *Alu* I, *Hae* III o *Kpn* I, en reacciones separadas en un volumen final de 15 µL con incubación por 2 h a 37 °C. 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 3 moléculas del inserto por una del vector. Para la transformación, 5 µL de cada producto de ligación se mezclaron con una alícuota de células TOP10F' ultracompetentes. Para el análisis de las colonias recombinantes se plaquearon 100 y 150 µL en medio de selección sólido Luria Bertani (LB) que contenía Ampicilina (60 mg mL<sup>-1</sup>) y Kanamicina (50 mg mL<sup>-1</sup>) con adición de 50 µL X-gal (20 mg mL<sup>-1</sup>) y 20 µL 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.

### Selección de bacterias transformadas y confirmación de la clonación del gen p25

Las clonas positivas se secuenciaron en nuestro Centro, mediante un estuche comercial Sequi Therm Excel II DNA Sequencing en el secuenciador DNA Analyzer (LI-COR Inc. Nebraska, EE.UU.). Una vez que se determinaron las secuencias nucleotídicas de la clonas de cada uno de los aislamientos en estudio, se procedió a realizar una comparación de éstas con las del banco de genes (GenBank; 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 (Thompson *et al.*, 1997), con lo cual se procedió a realizar el dendograma de similitud, con el programa Protdist del conjunto de programas Phylip

<http://pir.georgetown.edu/pirwww/search/multaln.html>  
(Felsenstein, 1993).

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Aislamientos del VTC de huertos cítricos comerciales del noreste de México se caracterizaron mediante técnicas moleculares. La detección del VTC a nivel mundial se realiza principalmente en forma inmunológica, mediante anticuerpos contra la proteína de la cubierta (cápside) del virus (Vela *et al.*, 1986; Permar *et al.*, 1990). Sin embargo, la técnica de inmunopresión y la PCR son más precisas, sobre todo esta última. De ahí que una de las principales metas fue 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, que presentan un tamaño de 688 pb y corresponden al gen de la cápside. En los carriles NL2, T2 y V2 se aprecia que se amplificaron algunos fragmentos inespecíficos, por lo cual 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. En las muestras NL1 y NL5 la amplificación fue débil, a pesar de haber intentado incrementar la concentración del RNA total y modificar varias condiciones de la reacción, como la temperatura de alineamiento, la cantidad del DNac y concentración del cloruro de magnesio. Las amplificaciones fueron pobres, debido a que probablemente la concentración del virus en el tejido era muy baja y la integridad de éste no era la óptima, lo que afectó la cantidad del RNA. Bar-Joseph *et al.* (1983) mostraron que las bajas concentraciones del RNA viral provocan una amplificación deficiente.

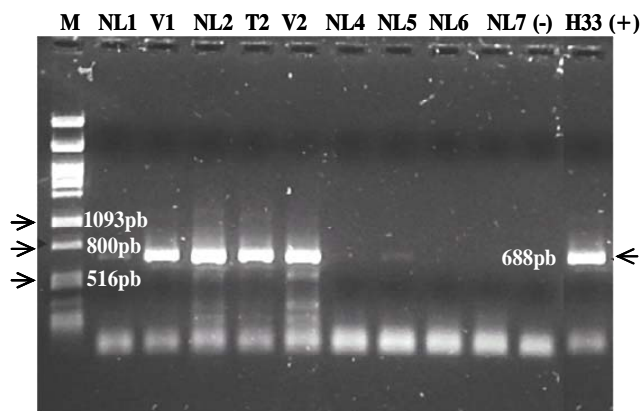


Figura 1. Amplificación del gen p25 del VTC. Cada carril corresponde a una muestra de los aislamientos de Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz. Los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa 1 %. El gen p25 corresponde al fragmento de 688 pb.

**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 obtuvieron con la enzima de restricción *Alu I*. Una vez realizados los RFLPs con la enzima *Alu I*, se procedió a elaborar un dendograma de similitud (datos no presentados) mediante diferentes programas computacionales (EMBOSS, Cross Checker y TreeView), para observar el agrupamiento de los aislamientos con base en el patrón de bandas. Este método no evidenció relación alguna entre los aislamientos del VTC; por un lado agrupa aislamientos considerados como débiles con el aislamiento H33, que es severo. Aunque un número mayor de aislamientos del VTC sería necesario para dar 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 de las severas.

Afortunadamente, el uso de las enzimas de restricción *Hae III* y *Kpn I* para caracterizar las razas del VTC, resultó útil en este estudio porque 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 ellas con el programa DNA STRAIDER (Marck, 1989), que incluyó mas 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 tienen conservado sólo el sitio *Hae III*, pero carecen del sitio *Kpn I*. Algo interesante es que las razas de virus que producen picado de tallo presentan tanto los sitios *Hae III* como *Kpn I*, con excepción de una única secuencia que sólo presentó el sitio *Kpn I*, aunque habría que aclarar que de este aislamiento no se tiene la certeza de su caracterización biológica.

Los análisis de los aislamientos NL1, V1 y NL2, que forman un mismo grupo junto 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 hizo 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 sólo un grupo junto con el testigo positivo H33. Estas enzimas solo presentaron un sitio de restricción en las secuencias de las razas severas.

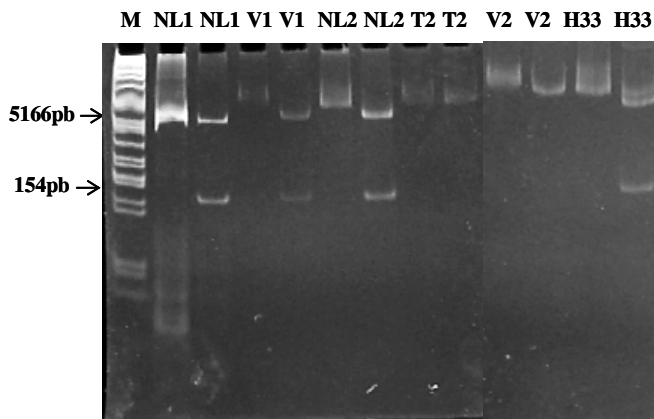


Figura 2. Perfil de RFLP del gen p25 con la enzima *Hae* III. Carril 1: M = Fago  $\lambda$  digerido con *Pst* I; 2: Fragmento de PCR de NL1 sin digerir; 3: Fragmento de PCR de NL1 digerido; 4: Fragmento de PCR de V1 sin digerir; 5: Fragmento de PCR de V1 digerido; 6: Fragmento de PCR de NL2 sin digerir; 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.

Gillings *et al.* (1993) 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 al definir siete grupos, y que algunos de ellos engloban aislamientos con características biológicas similares. En nuestro estudio, la enzima *Hae* III fue la que resultó útil para discriminar las razas débiles de las severas, ya que genera un sólo 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. Entonces, el protocolo desarrollado en este trabajo ofrece ventajas sobre los previamente reportados, porque un corte con la enzima basta para discriminar entre 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 para diferenciar o separar las razas débiles de las severas se basa en la utilización de anticuerpos monoclonales obtenidos a partir de partículas virales de razas débiles o severas mediante un análisis tipo ELISA (Moreno *et al.*, 1996). Sin embargo, este método ya ha sido rebasado por las nuevas tecnologías moleculares. Por tal razón, se considera que el método aquí propuesto resulta más sencillo para la separación de variantes del VTC.

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

Para el gen p25 (cápside) se lograron obtener cinco secuencias nucleotídicas completas de 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, que resultaron cercanas a 80 %. Pappu *et al.* (1993) 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 80 % entre las secuencias de aminoácidos de los 11 aislamientos analizados, lo cual concuerda con los porcentajes aquí reportados.

Los aislamientos CBG-NL1, CBG-NL2 y CBG-V1 mostraron 96 % de similitud con respecto a razas que ocasiona picado del tallo y declinamiento, mientras que el aislamiento CBG-V2 presentó 99 % de identidad con la cepa T30 clasificada como débil. Estos análisis mostraron diferencias entre secuencias y, por 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: donde el aislamiento CBG-V2 presenta una serina (S) en el residuo 49, mientras que los otros tres aislamientos poseen una glicina (G). Así mismo, en el residuo 63, el aislamiento CBG-V2 presenta una alanina (A), mientras que en los otros aislamientos se conserva una treonina (T) (Figura 3).

Posteriormente se hizo un alineamiento múltiple de las secuencias antes mencionadas con las ya reportadas como referencia. En este análisis se encontró que en las razas severas los residuos 49, 63 y 124 se encuentran conservada una glicina (G), una treonina (T) y una fenilalanina, respectivamente; mientras que en las razas consideradas como 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, aunque Pappu *et al.* (1993) describieron que las razas severas tienen conservado el aminoácido fenilalanina (F) y 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. Aquí se propone que estos residuos podrían jugar un papel muy importante en la patogenicidad del VTC, que valdría la pena estudiar más adelante.

Es de destacar 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. En cambio, 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 nucleotídico que se presenta en la secuencia, a raíz de la presencia del sitio *Kpn* I, es en la tercera posición del

```

CBG-NL1      MDEETKLLKNKNKETKEGDNVVAEASSFGSVNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-V1      MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEASSFGSMNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-V2      MDEETKLLKNKNKETKEGDEVVAEASSFGSVNLHIDPTLITMNDVRLSTQQNAALNRDL
CBG-NL2     MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEASSFGSMNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-T2      MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEASSFGSMNLHIDPTLIAMNDVRLGTQQNAALNRDL
*****:***:***:*****:*****:*****.*****

CBG-NL1     FLTLKGGKYPNLSDKDKDFHIAM-MLYRLVVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVLSDKLW
CBG-V1     FLTLKGGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLPDKLW
CBG-V2     FLALKGGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
CBG-NL2     FLTLKGGKYPNLPDKDKDFHIGYDVVIVIAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLPDKLW
CBG-T2     FLTLKGGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVDVDPDKLW
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

                                H

CBG-NL1     TDVVFNSKGIGNRANALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-V1     TDVVFNSKGIGNRTNALRVWGRNDALSCLFCVTHLSYGGQYRNLSSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-V2     TDIVYNSKGIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-NL2     TTSCLTPRVMVTVLTPEVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-T2     TDVVFNSKGIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
*      . . . : . . . :*****      :*:* * *****

CBG-NL1     HYLCAFLTGAGLTDLEVCAYVIEAKGSNCCRSEGLIKSYYHVRQLGKFNTR
CBG-V1     HYLCAFLTGAGLTDLE-CAVYIQAKEQLFEEAR-SVNRVTNCQAAWEI---
CBG-V2     HYLCAFLTGAGLTDLE-CAVYIQAKEQLLKKRGADEVVVTNVRQLGKFNTR
CBG-NL2     HYLCAFLTGAGLTDLEVCAYVIEAKGSNCCRSEGLIKSYYHVRQLGKFNTR
CBG-T2     HYLCAFLTGAGLTDLE-CAVYIQAKEQLLKKRGADEVVVTNVRQLGKFNTR
****.***** *****:** . . . : : :
    
```

Figura 3. Alineamiento múltiple de secuencias aminoácidas del gen p25. Los asteriscos (\*) indican aminoácidos idénticos; (:) indica grupos de aminoácidos fuertemente conservados; (.) indica grupos de aminoácidos débilmente conservados. Los residuos 49, 63 y 124, glicina (G), treonina (T) y fenilalanina (F) se encuentran conservados en razas consideradas como severas. Se indica el sitio de corte con *Hae* III = H y el sitio de corte con *Kpn* I = K.

codón de treonina; por tanto, el cambio es a nivel nucleotídico y no a nivel aminoacídico. Asimismo, la enzima *Hae* III corta en la tercera posición de un codón de alanina, que es un cambio también silencioso.

A partir del alineamiento múltiple de las secuencias obtenidas en este trabajo, junto con las ya reportadas y caracterizadas biológicamente por Pappu *et al.* (1993): T36 (declinamiento), SY568 (picado de tallo), T30 y T385 (débiles), se procedió a elaborar el dendograma de similitud y al mismo tiempo obtener las distancias entre las secuencias de aminoácidos, con el programa Protdist del paquete Phylip. El dendograma (Figura 5) mostró que los aislamientos CBG-NL1, CBG-NL2, CBG-V1 y CBG-T2 formaron un grupo muy cercano a las razas severas T36 y SY568 (todas presentando los sitios *Hae* III y *Kpn* I), y que el aislamiento CBG-V2 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, con distancias entre 1.4 y 1.6 (Figura 4).

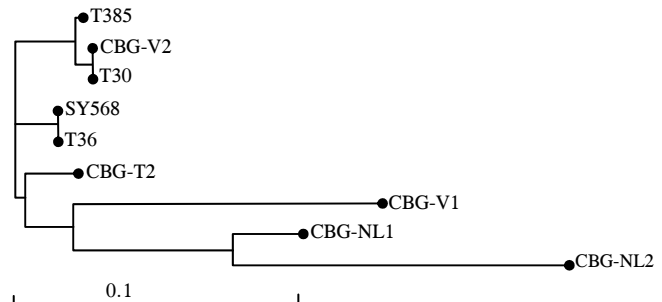


Figura 5. Dendograma de similitud de los diferentes aislamientos del VTC mediante análisis computacional de las secuencias aminoácidas del gen que codifica para la cápside. Los aislamientos de referencia son el T36 (severo, declinamiento); SY568 (severo, picado de tallo); T30 (débil) y T385 (débil).

Con base en lo anterior, se considera 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 tanto, esta técnica sería potencialmente más rápida y confiable para discriminar los tipos de razas de VTC, siempre que se aumente el número de secuencias analizadas y que se cuente con su caracterización biológica.

```

CBG-V2      MDEETKLLKNKNKETKEGDEVVAEESFFGSVNLHIDPTLITMNDVRLSTQQNAALNRDL
T30         MDEETKLLKNKNKETKEGDEVVAEESFFGSVNLHIDPTLITMNDVRLSTQQNAALNRDL
T385       MDEETKLLKNKNKEMKEGDDVVAEESFFGSVNLHIDPTLITMNDVRLSTQQNAALNRDL
SY568      MDEETKLLKNKNKETKEGDDVVAEESFFGSLNLHIDPTLIAMNDVRLGTQQNAALNRDL
T36        MDEETKLLKNKNKETKEGDDVVAEESFFGSLNLHIDPTLIAMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-NL1    MDEETKLLKNKNKETKEGDNVVAEESFFGSVNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-V1     MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEESFFGSMNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-NL2    MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEESFFGSMNLHIDPTLITMNDVRLGTQQNAALNRDL
CBG-T2     MDEETKLLKNKNKEAKEGDDVVAEESFFGSMNLHIDPTLIAMNDVRLGTQQNAALNRDL
*****

CBG-V2      FLALKGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
T30         FLALKGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
T385       FLALKGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
SY568      FLTLKGKYPNLSDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
T36        FLTLKGKYPNLSDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
CBG-NL1    FLTLKGKYPNLSDKDKDFHIAM-MLYRLVVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
CBG-V1     FLTLKGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
CBG-NL2    FLTLKGKYPNLPDKDKDFHIGYDVVIVIAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
CBG-T2     FLTLKGKYPNLPDKDKDFHIAM-MLYRLAVKSSSLQSDDDTTGITYTREGVEVDLSDKLW
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

CBG-V2      TDIVYNSKGIIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
T30         TDIVYNSKGIIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
T385       TDIVYNSKGIIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
SY568      TDVVFNKSGIIGNRTNALRVWGRSNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
T36        TDVVFNKSGIIGNRTNALRVWGRSNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-NL1    TDVVFNKSGIIGNRANALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-V1     TDVVFNKSGIIGNRTNALRVWGRNDALSFCVTHLSYGGQYRNLISYGGRPLDAGIPAGY
CBG-NL2    TTSCLTTPRMVTVLTPVEVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
CBG-T2     TDVVFNKSGIIGNRTNALRVWGRNDAL-----YLAFCRQNRNLSYGGRPLDAGIPAGY
*   . . : . . . : * * * * * : * * * * * : * * * * * * * * * * * * * * * *

CBG-V2      HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
T30         HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
T385       HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
SY568      HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
T36        HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
CBG-NL1    HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
CBG-V1     HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLFEEAR-SVNRTVNCQAWEI---
CBG-NL2    HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
CBG-T2     HYLCAFLFTGAGLTDLE-CAVYIQAQEQLLKKGGADEVVVTNVRQLGKFNTR
*****

```

Figura 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.

**CONCLUSIONES**

Los RFLPs del gen de la cápside con la enzima *Alu I*, no permitió agrupar ni diferenciar los aislamientos del VTC de acuerdo con su perfil electroforético comparado con una raza severa. En cambio, el análisis de las secuencias del gen de la cápside mostró que las razas severas tienen el sitio *Hae III*, y dentro de éstas, mediante la enzima *Kpn I*, se logró separar las que causan picado de tallo de aquéllas que causan declinamiento.

Los dendogramas de similitud generados a partir de las secuencias de aminoácidos del gen de la cápside permitió separar las razas severas de las débiles. 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. 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**

Investigación financiada por SIREYES-CONACYT (Proyecto 20000601009), y CGPI-Instituto Politécnico Nacional. A la SAGARPA por facilitar las muestras de tejido infectado y a Maurilio González por su valiosa ayuda con el paquete computacional Phylip.

**BIBLIOGRAFÍA**

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. *J. Virol.* 74: 6856-6865.

- 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.
- Bar-Joseph, M A Rosner, H Moscovitz, R Mull (1983) A simple procedure for the extraction of double – strand RNA from virus infected plants. *J. Virol.* 6: 1-8
- Cepeda-Nieto A C, H A Barrera-Saldana (1997). Cloning and sequencing of the coat protein gene of a new isolate of citrus tristeza virus from Mexico. *Plant Dis.* 81: 693.
- 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.
- Felsenstein J (1993) *Phylip (Phylogeny Inference Package)*. Versión 3.5c. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- 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. *J. Virol. Methods* 44: 305-317.
- Goda-S-K AU, N P Minto TI (1995) A simple procedure for gel electrophoresis and Northern blotting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 23:3357-3358.
- Han S O, P B New (1998) Variation in nitrogen fixing ability among natural isolates of *Azospirillum*. *Microbial Ecol.* 36: 193-201.
- Lee R F, M A Rocha-Peña (1992) Citrus Tristeza Virus. *In: A N Mukhapadhyay, H S Chaube, J Kumar, U S Singh (eds)*. *Plant Diseases of International Importance III*. Prentice Hall. New Jersey. pp: 226-249.
- 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 Benschner, E J Anderson, M Price, F Ochoa, C L Niblett (1996) Progress on strain differentiation of Citrus Tristeza Virus. *Rev. Mex. Fitopatol.* 14: 79-87.
- LI-COR (2000) *DNA Sequencing Manual*. Lincoln, Nebraska 68504.
- 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 Res.* 49: 79-89.
- Marck Ch (1989). A C program for DNA and Protein analysis. Service de Biochimie, Département de Biologie, Institute de Recherche Fundamentale CEA. France.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Dis.* 79:437-445.
- Roistacher C N, P Moreno (1991) The worldwide threat from destructive isolates of citrus tristeza virus – A review. *In: Proc. 11th. Conf. of the Inter. Organ. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 7-19.
- 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 Res.* 24:4876-4882.
- 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. *J. Gen. Virol.* 67:91-96.