



CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FILODINÁMICA DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE LOS CÍTRICOS

Benítez, María José¹; Bertalmío, Ana²; Rubio, Leticia²; Rivas, Fernando²; Maeso, Diego²; Colina, Rodney¹.

¹ Laboratorio de Virología Molecular, Universidad de la República, CENUR Noroeste, Sede Salto, Uruguay.

² Programa Nacional de Investigación en Producción Citrícola, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Uruguay.

Palabras Clave: Virus de la Tristeza de los Cítricos; Técnicas Moleculares; Filogenia; Recombinación; Protección Cruzada.

Introducción

Desde que apareció hace dos siglos atrás, la enfermedad conocida como Tristeza, es la enfermedad viral más devastadora de la industria cítrica a nivel mundial (Roistacher *et al.*, 2010). Su agente etiológico, el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), es transmitido por injerto de material vegetal infectado o principalmente por áfidos de los géneros *Toxoptera* y *Aphis* (Gray & Banerjee, 1999; Moreno *et al.*, 2008). La existencia de variantes genéticas del virus con diversos grados de severidad, han sido reportadas en todas las áreas cítricas afectadas del mundo. La presencia de CTV y su vector más eficiente, *T. citricida*, ha sido descrita en Uruguay desde los años 40 (Koch de Brotos & Boaso, 1955). Sin embargo, no existen datos basados en biología molecular que reflejen las variantes que circulan en el país, por lo que, entendemos que realizar estudios moleculares en profundidad de aislados uruguayos de CTV provenientes de razas asociadas a distintos grados de severidad, es de suma importancia. Estos estudios nos permitirán establecer cuáles son las principales variantes genéticas circulantes en el país, y que similitudes o relaciones filogenéticas tienen con otras provenientes de la región u otras zonas del mundo. Por otro lado, el desarrollo de metodologías de diagnóstico y caracterización molecular, desarrolladas por primera vez en el país, serán de gran utilidad para la detección temprana del virus y podrán ser utilizadas para complementar el saneamiento y certificación de los materiales liberados por el Plan Nacional de Saneamiento de Citrus y también por los productores en general. A su vez, se podrá caracterizar molecularmente los aislados, con el fin de acercarnos en la búsqueda de una cepa suave protectora para el desarrollo de un futuro sistema de Protección Cruzada.

Materiales y Métodos

En el presente trabajo se utilizó un total de 15 muestras de campo obtenidas en dos etapas (Tabla 1). Posterior a la colecta, las muestras fueron injertadas en Lima



IV Simposio Nacional
I Congreso Latinoamericano
Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus
3-5 de noviembre de 2014. Salto, Uruguay



mejicana (*Citrus aurantifolia*), con cuatro repeticiones por muestra, para realizar el testaje biológico, con el fin de evaluar la sintomatología de los aislamientos; y en plantas de Limón rugoso (*Citrus jambhiri*) para conservar el inóculo, siendo en ambos casos mantenidas en invernaderos libres de insectos, con temperatura y humedad controladas, en el banco de muestras del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) en su sede de Salto Grande. También se realizó el diagnóstico de las muestras mediante ELISA. Como controles positivos para estandarizar las metodologías utilizadas se trabajó con dos muestras colectadas en San José y Paysandú, en los años 1993 y 2006 respectivamente, mantenidas *in planta* en el INIA, inoculadas con CTV. Plantas libres del virus fueron usadas como controles negativos.

Tabla 1. Muestras utilizadas en el presente trabajo. Se detalla año de colecta, procedencia, variedad, resultado del ELISA y testaje biológico, y aspecto del árbol al momento de la colecta. NR, No Realizado.

Muestra	Código	Año de colecta	Procedencia	Variedad	ELISA	Testaje Biológico	Aspecto del árbol en campo
119	TRU7	1993	San José	Limón (<i>Citrus limon</i>)	NR	NR	
120	FOR1	2006	Paysandú	Naranja Navel (<i>C. sinensis</i>)	NR	NR	
121	MILCH2	1997	Salto	Pomelo Star Ruby (<i>C. paradisi</i>)	Negativo	VC, SP suave	Sin vigor
122	MILCH3				Positivo		
123	AD6M1	1998	San José	Limón (<i>Citrus limon</i>)	Positivo	VC suave, Psorosis shock, SP moderado VC, Psorosis shock, SP moderado SP severo	Altura normal
124	AD6M2				No claro		
125	AD7M1				Negativo		
163	CCH3	1996	Salto	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i>)	Positivo	SP suave	Sin vigor
164	AD5M1	1998	San José	Limón (<i>Citrus limon</i>)	Positivo	VC, LC, SP severo	Sin vigor
165	AD9M1			Naranja Valencia (<i>C. sinensis</i>)	Positivo	VC, LC, Vck	Sin vigor
166	MO14		Canelones	Limón (<i>Citrus limon</i>)	Negativo	VC suave, manchas cloróticas, Psorosis shock, SP severo VC, LC, Vck, SP moderado	Sin vigor
167	MO16				Positivo		Altura normal
168	SOM1				Pomelo Star Ruby (<i>C. paradisi</i>)	No claro	VC, LC
MIL2012		2012	Salto	Mandarina Satsuma Owari (<i>C. reticulata</i>)	NR	NR	Árbol destacado por tamaño y producción de fruta
CAP2012						NR	

La extracción del ARN total se realizó con el *RNeasyPlant Mini Kit* de QIAGEN según recomendaciones del fabricante y la síntesis del ADN copia se realizó utilizando *primers* randómicos. Se estandarizó un sistema de detección rápido y sensible, por PCR en tiempo real con tecnología TaqMan, mediante la amplificación de un fragmento de la región 3'UTR del genoma viral. Para la caracterización de los aislados, se amplificaron por PCR en tiempo final, tres genes del genoma de CTV (p25, p20 y p23) mediante protocolos publicados por Iglesias y colaboradores (2008) y Rubio y colaboradores (2001). Los resultados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% y los amplicones purificados mediante el uso de kits comerciales siguiendo las normas del fabricante. La secuenciación de los aislados se realizó de manera bidireccional en la plataforma del Instituto Pasteur de Montevideo. Por otro lado, y con el objetivo de conocer la composición de las poblaciones virales, se clonaron los amplicones para los tres genes analizados para el total de las muestras. Se analizó un total de al menos 10



clones por muestra y se secuenciaron bidireccionalmente como en el caso anterior. La edición de las secuencias nucleotídicas se realizó con el programa SeqMan, y los alineamientos con sus correspondientes análisis filogenéticos se realizaron con el programa MEGA 6. Los árboles filogenéticos se realizaron con el método *Neighbor Joining* bajo el modelo *Kimura 2 Parameter* con un apoyo estadístico de 1000 pseudoréplicas. Para la realización de los análisis de aislados recombinantes, se utilizaron los programas *SimPlot*, *Bootscan*, *GARD* y *SBP*. Los análisis de coalescencia, para estimar el ancestro común más reciente (tMRCA) y la tasa de evolución, se realizó con el paquete BEAST.

Resultados y Discusión

En el presente estudio se implementa, por primera vez en Uruguay, un método de detección del genoma de CTV por RT-PCR en tiempo real con química TaqMan que constituye una herramienta rápida, confiable y precisa. Esta herramienta permitirá el procesamiento de un gran número de muestras lo que puede ser de gran utilidad tanto para los productores como para las entidades de vigilancia sanitaria.

También se realizó el primer estudio de caracterización molecular de las variantes genéticas que circulan en el país, en base al análisis de la secuencia completa de los genes p25, p20 y p23. Mediante este análisis detectamos la presencia de cuatro linajes co-circulantes con distinta prevalencia, tres de ellos previamente descritos (VT, T3 y T36) y el cuarto identificado en este trabajo, denominado linaje Sudamericano, SA. Este último linaje está compuesto exclusivamente por aislados de Uruguay y Argentina. El genotipo más prevalente fue el genotipo VT, como ha sido reportado para el resto del mundo. Estos resultados muestran que las cepas que circulan en nuestro país presentan una gran variabilidad genética, así como las que circulan en la región y el mundo.

Se detectó también la presencia de un aislado recombinante, procedente de un evento de recombinación entre los aislados T36 y NZ-M16. Sin embargo, algunas de las variantes de este aislado, también recombinantes, mostraron cierta divergencia respecto a la secuencia recombinante inicial.

Por último, mediante análisis de coalescencia, fuimos capaces de datar el ancestro común más reciente del linaje Sudamericano, así como también calcular la tasa de evolución del mismo. Se logró también modelar el comportamiento de la población de este linaje a lo largo de la historia, desde su origen al presente, identificando eventos que explican las fluctuaciones ocurridas por el tamaño de la población del virus en el tiempo.

Consideramos que los resultados obtenidos en este trabajo serán de gran utilidad para los productores y entidades de vigilancia sanitaria, con el objetivo de incorporarlos a los subsiguientes planes de manejo y control. Cabe resaltar que este trabajo consiste en el



IV Simposio Nacional
I Congreso Latinoamericano
Investigación y Desarrollo Tecnológico en Citrus
3-5 de noviembre de 2014. Salto, Uruguay



primer registro en Uruguay de diagnóstico y caracterización de CTV mediante el uso de técnicas moleculares.

Bibliografía

Gray S & Banerjee N. 1999. Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microb. and Mol. Biology Reviews* 63 (1):128-148.

Iglesias NG, Gago-Zachert SP, Robledo G, Costa N, Plata MI, Vera O, Grau O & Semorile LC. 2008. Population structure of Citrus tristeza virus from field Argentinean isolates. *Virus Genes* 36:199–207.

Koch de Brotos L. & Boasso C. 1955. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Ministerio de Ganadería y Agricultura. Dirección de Agronomía. Laboratorio de Fisiología y Patología Vegetal. Publicación N° 106. 65p.

Moreno P, Ambros S, Albiach-Marti MR, Guerri J & Peña L. 2008. Plant diseases that changed the world Citrus tristeza virus: a pathogen that changed the course of the citrus industry. *Mol Plant Pathol* 9:251-268.

Roistacher CN, da Graça JV & Müller GW. 2010. Cross Protection Against Citrus Tristeza Virus a Review. En: *Proceedings of the 17th Conference of the International Organization of Citrus Virologists* (Brlansky RH, Lee RF, Timmer LW, Eds). Riverside, CA, USA: IOCV pp. 1-27.

Rubio L, Ayllon MA, Kong P, Fernandez A, Polek ML, Guerri J, Moreno P & Falk BW. 2001. Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J Virol* 75:8054-8062.