

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA p20 DEL VIRUS DE LA *TRISTEZA*
DE CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE**

Por:

L.Q. Claudia Gabriela Murga Sánchez

Como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
Orientación en Microbiología Industrial

Dirección de Tesis:

Dra. Ma. Magdalena Iracheta Cárdenas

Dr. Alberto Gómez Treviño

Junio 2010

**PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA p20 DEL VIRUS DE LA *TRISTEZA*
DE CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE**

Comisión de Aprobación de Tesis:

**Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño.
Presidente**

**Dra. Ma. Magdalena Iracheta Cárdenas.
Secretaria**

**Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Vocal**

**Dra. María Teresa Garza González
Sub-directora de Estudios de Posgrado**

**PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA p20 DEL VIRUS DE LA *TRISTEZA*
DE CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE**

Comisión de Revisión de Tesis:

Dr. Mario Alberto Rocha Peña.

Dra. Maria Elena Cantú Cárdenas

Dra. Martha Alicia Suárez Herrera

RESUMEN

Claudia Gabriela Murga Sánchez

Fecha de graduación Junio, 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: Producción *in vitro* de la proteína p20 del Virus de la Tristeza de los Cítricos mediante técnicas de DNA recombinante.

Número de páginas: 60

Candidato para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Orientación en Microbiología Industrial.

Área de estudio: Microbiología

El Virus de la Tristeza en los Cítricos (CTV) es el agente causal de una de las enfermedades en plantas económicamente más devastadoras a nivel mundial. La enfermedad es originaria de Asia y ha ocasionado la muerte de más de 40 millones de árboles en el planeta. México tiene el quinto lugar a nivel mundial en la producción de cítricos, en el estado de Nuevo León, existe actualmente un aproximado de 30,000 hectáreas dedicadas a la citricultura. La gran producción de plantaciones cítricas es vulnerable a infecciones de CTV, donde la naranja ocupa un 60% en plantaciones de citricultura, el limón un 28% y el resto dividido entre toronjas y mandarinas. El objetivo del trabajo fue aislar el gen que codifica para la proteína p20 del *Virus de la Tristeza en Cítricos* mediante técnicas de DNA recombinante. Las muestras de tejido fueron recolectadas a partir de árboles infectados con CTV originarios de México. Se realizó una extracción de RNA y se obtuvo el DNA complementario con *primers* específicos por medio de retrotranscripción acoplada a PCR (RT-PCR), se estandarizaron condiciones para la amplificación del DNA y se llevó a cabo la ligación del gen p20 en un vector plasmídico. El producto de la ligación se utilizó para transformar JM109 de *E.coli* JM109 y HB101 y se seleccionaron clonas transformantes para hacer una extracción y purificación del DNA plasmídico comprobando la clonación con PCR, de lo cual se utilizó para inocular conejos y obtener anticuerpos que reconocieran la proteína p20 por medio de la técnica *Western Blot*. Se realizaron electroforesis en gel de agarosa para observar la amplificación del gen p20 para la RT-PCR y la PCR con las condiciones estandarizadas. Se obtuvo una banda por encima de las 500 pb que corresponde con el tamaño del fragmento. El producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar *E.coli* utilizando ampicilina, X-gal e IPTG como marcadores de selección. Las clonas seleccionadas fueron analizadas por PCR. En las inmunodetecciones realizadas se observaron claramente bandas en las muestras de tejido y en las muestras de fermentación para las clonas JM109 y HB101 de *E. Coli*. Como conclusión se logró clonar el gen que codifica para la proteína p20 del *Virus de la Tristeza de los Cítricos* y se comprobó con un anticuerpo de conejo que reconoce la proteína p20 en tejido vegetal.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por el amor que me ha dado, por esta vida y por ser mi guía en un camino de oportunidades

Al Dr. Alberto Gómez, por ser un excelente asesor, paciente, tranquilo, por enseñarme excelentes técnicas moleculares de su propia mano y por todo el apoyo durante mi tiempo fuera de casa

A mi familia porque sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible

A Julián por estar conmigo en mis mejores y peores momentos y permitirme estar en los tuyos también

A la Dra. Magda Iracheta y al Dr. Mario Rocha por haberme dado la oportunidad de trabajar en este proyecto y ayudarme a mejorar en mis técnicas inmunológicas

A la ya Dra. Ma. Elena Cantú, por ser tanto una maestra para mí como una excelente compañera de trabajo en el laboratorio y por su confianza

Al Q.F.B. Eduardo de la Rosa por ayudarme, enseñarme y regañarme para mejorar mis técnicas moleculares

A mis amigos por aceptarme y por su apoyo moral

A CONACyT por el apoyo económico brindado al proyecto CB-200783427

A la Facultad de Ciencias Químicas

DEDICATORIA

Miguel Ricardo, Sonia y Renata... love you too very much

Julián... TM

ÍNDICE

	Páginas
Introducción	
I. La enfermedad “Tristeza” de los Cítricos	1
II. Distribución geográfica del virus tristeza de los cítricos	5
III. Propiedades del virus tristeza de los cítricos	6
IV. Proteína p20 del virus tristeza de los cítricos	8
V. Diagnóstico del virus tristeza de los cítricos en plantas infectadas	10
Hipótesis	12
Justificación	12
Objetivo General	13
Objetivos específicos	13
Materiales y métodos	
I. Recolección de muestras de tejido vegetal.	14
II. Extracción de RNA del Virus de la Tristeza de los Cítricos	15
III. Obtención de DNA complementario para la proteína p20 de CTV.	17
<i>i)</i> Diseño de Primers	17
<i>ii)</i> Retro-transcripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
<i>iii)</i> Estandarización de Condiciones para la Reacción en Cadena de la Polimerasa	20
IV. Clonación Molecular del Gen de la Proteína p20 de CTV.	21
<i>i)</i> Reacción de Ligación	22
<i>ii)</i> Transformación de <i>E. coli</i>	24
<i>iii)</i> Confirmación de la clonación del Gen de la Proteína p20 de CTV	25
V. Producción de la proteína p20 recombinante.	27
<i>i)</i> Inducción de la Expresión de la proteína p20	27
VI. Verificación de la expresión de la proteína p20 recombinante	28
VII. Secuenciación del gen p20 del CTV	29

Resultados	
I. Recolección de muestras de tejido vegetal.	30
II. Extracción de RNA del Virus de la Tristeza de los Cítricos	31
III. Obtención de DNA complementario para la proteína p20 de CTV	31
<i>i)</i> Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa	31
<i>ii)</i> Estandarización de condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa	35
IV. Clonación Molecular del Gen de la Proteína p20 de CTV	33
<i>i)</i> Transformación de E. coli	33
<i>ii)</i> Confirmación de la clonación del Gen de la Proteína p20 de CTV	34
V. Producción de la proteína p20 recombinante	37
<i>i)</i> Inducción de la Expresión de la proteína p20	43
VI. Secuenciación	41
Discusión	43
Conclusiones	47
Recomendaciones	48

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas de Materiales y Métodos

Tabla 1. Resumen de información de la colección de muestras de tejido de árboles infectados de árboles de cítricos con diagnóstico positivo para CTV.	15
Tabla 2. Secuencia de iniciadores empleados en amplificación del cDNA del gen de la proteína p20 de CTV.	17
Tabla 3. Componentes de Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).	18
Tabla 4. Ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a las etapas de Retro-transcripción acopladas a la reacción en cadena de la Polimerasa.	19
Tabla 5. Componentes Reacción en Cadena de la Polimerasa.	21
Tabla 6. Componentes de la Reacción de ligación.	24
Tabla 7. Muestras de tejido de árboles infectados de árboles de cítricos con diagnóstico positivo para CTV mediante serología con anticuerpos anti-p25.	30

Figuras

Figura 1. Pulgón café de los cítricos, <i>Toxoptera citricida</i> .	2
Figura 2. Efectos del Virus de la Tristeza de Cítricos.	4
Figura 3. Virus de la Tristeza de los Cítricos.	8
Figura 4. Fotomicrografía de tejido infectado con CTV T36.	9
Figura 5. Esquema del cDNA de la proteína p20 de CTV obtenido mediante PCR.	23
Figura 6. Esquema del vector plasmídico pGEM-T.	23
Figura 7. Productos de amplificación en gel de agarosa de la proteína p20.	32
Figura 8. Productos de amplificación en gel de agarosa de la proteína p20.	33

Figura 9. Colonias 1-23 transformadas.	34
Figura 10. Prueba de la actividad de β -galactosidasa.	35
Figura 11. Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína p20.	36
Figura 12 Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína p20.	36
Figura 13. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%.	37
Figura 14. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%.	38
Figura 15. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%.	39
Figura 16. Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceu.	40
Figura 17. Inmunodetección en la membrana de nitrocelulosa transferida.	41
Figura 18. Reporte de resultados obtenidos de la secuenciación del gen p20 de CTV del aislamiento MX14 comparados con el aislamiento de referencia T36.	42

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

PRODUCCIÓN *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA p20 DEL VIRUS DE LA TRISTEZA DE CÍTRICOS MEDIANTE TÉCNICAS DE DNA RECOMBINANTE

Por:

L.Q. Claudia Gabriela Murga Sánchez

Como requisito para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
Orientación en Microbiología Industrial

Dirección de Tesis:

Dra. Ma. Magdalena Iracheta Cárdenas

Dr. Alberto Gómez Treviño

Junio 2010

INTRODUCCIÓN

I. La enfermedad “Tristeza” de los Cítricos

La “Tristeza” es una de las enfermedades virales económicamente más agraviantes alrededor del mundo en árboles cítricos y su agente causal es el virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus* = CTV) [1]. El virus aparentemente es originario del sureste asiático y ha ocasionado la muerte de más de 40 millones de árboles en el planeta [1]. Simplemente en la actualidad en México, existen más de 500 mil hectáreas de cítricos vulnerables a la infección [2]. El CTV puede infectar todas las especies cultivadas e híbridos intergenéricos de cítricos de la familia Rutaceae, así como también algunos géneros emparentados de cítricos [1].

El virus tiene un tropismo de floema en las plantas cítricas y su presencia en una plantación se debe generalmente por el uso y el movimiento de materiales de propagación infectado (plantas de viveros) [1,2,4,5]. La dispersión del virus de árboles infectados a sanos en el campo, es llevada a cabo mediante transmisión por varias especies de áfidos [2] en una forma semi-persistente, siendo el pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) el vector más eficiente en la transmisión de las partículas virales [3,4,5]. Es importante señalar que este áfido se encuentra presente en el Continente Americano, incluyendo en México, en América Central y América del Sur [3], lo que hace comprensible el rigor de las políticas de control para su propagación [2]. *Aphis gossypii* también es un vector

eficiente, aunque no se encuentra en abundancia en árboles cítricos. *Aphis citricola* y *Toxoptera aurantii* son vectores menos eficientes en la transmisión del virus pero son más abundantes en cítricos [3,4,6].



Figura 1. Pulgón café de los cítricos, *Toxoptera citricida* (Kirkaldy). Insecto vector más eficiente del virus tristeza de los cítricos (Tomado de: M. Miyazaki National Institute of Sericultural and Entomological Science, 2001).

El CTV ocasiona una serie de síndromes en las diferentes hospedantes cítricos que infecta, siendo el daño mas dramático el decaimiento repentino en todas las variedades comerciales injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) [1,4,5]. El CTV es genética y biológicamente diverso, lo cual le permite causar los síntomas que se describen a continuación [1,4,5]. A) Infecciones latentes sin aparente manifestación de síntomas; B) Decaimiento gradual o rápido hasta causar la muerte; C) Picado de tallo; D) Amarillamiento en plántulas a nivel de invernadero.

Lo anterior está relacionado directamente con la raza del virus, tiempo de la infección, combinación variedad/porta-injerto y condiciones ambientales. Los síntomas ocasionados por el virus en la parte aérea se presentan por medio de:

1. Un colapso rápido: El colapso rápido es corto, con un tiempo de vida de una a dos semanas y se presenta como un marchitamiento progresivo en las hojas de los árboles afectados, simulando los síntomas de una deshidratación dejando a los árboles secos.
2. Un decaimiento lento: En el decaimiento lento, los árboles cambian de color verde claro a mate, generalmente seguido de un amarillamiento, produciéndose defoliación y muerte de sus ramillas desde afuera hacia dentro del árbol, el cual, pierde vigor y aunque presenta brotes nuevos, éstos se producen en ramas gruesas; el volumen de la copa se va reduciendo y los frutos son pequeños, tomando prematuramente un color amarillo.

La sintomatología antes descrita se presenta generalmente en verano, cuando se presentan altas temperaturas en combinación con estrés ocasionado por períodos de sequía. Los árboles afectados pueden permanecer vivos durante varios años, pero sin tener valor comercial. Otro síntoma que se ha observado es la disminución del diámetro del tronco del patrón con respecto de la variedad, acompañado de un engrosamiento del tronco inmediatamente por encima de la línea de injerto [1,6]. El virus tiene un efecto en los tejidos conductores justo

debajo de la unión en la variedad porta-injerto; afecta los vasos conductores y a sus células, perdiendo turgencia y estructura, y produciendo una hipertrofia de las células del parénquima [1,6].



Figura 2. Efecto del virus de la tristeza en plantas de cítricos. Pueden apreciarse diversas manifestaciones de la infección por CTV. Deshidratación y muerte de un árbol (superior izquierda), daños en tronco (superior derecha) y efectos sobre tamaño y color de los frutos (inferior derecha). Vista aérea de huerto de cítricos con zonas claras que pertenecen a árboles afectados por CTV (inferior izquierda) [USDA Research Services, 2001].

Existen trabajos de investigación en que se han caracterizado las propiedades biológicas de aislamientos del CTV en diferentes hospedantes cítricos [1,4,7]

Las razas T30 y T55 provocan infecciones débiles mientras que T36 y T66 causan un decaimiento severo en las plantas injertadas sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.), así como cambios de color en plantas de toronja (*C. paradisi*), naranjo agrio y limón (*C. limon*) y ocasionalmente leves picaduras en tallo [1,4,5,7].

II. Distribución geográfica del virus tristeza de los cítricos

El origen del CTV se ubica en el sureste asiático [1]; sin embargo, actualmente se encuentra prácticamente presente en la mayoría de las regiones cítricas del mundo [1,4-6]. A continuación se presenta un esquema de la distribución de territorios donde se han presentado casos de infecciones por CTV en diversas especies de cítricos:

1. Región Europea: Se han reportado infecciones en Israel, España, Turquía, Francia e Italia.
2. En Asia: China, Chipre, Georgia, India, Indonesia, Irán, Japón, Jordania, República Democrática de Corea, República de Corea, Malasia, Nepal, Pakistán, Filipinas, Arabia Saudita, Sri Lanka, Taiwán, Tailandia, Turquía, Yemen y Vietnam.
3. En África: Argelia, Camerún, República Central Africana, Chad, Egipto, Etiopía, Gabon, Ghana, Kenia, Libia, Marruecos, Mozambique, Nigeria, Tanzania, Túnez, Zaire, Zambia y Zimbabwe.
4. Norteamérica: Bermudas, México, Estados Unidos.
5. América Central y Caribe: Antigua y Barbuda, Bahamas, Belice, Costa Rica, Rep. Dominicana, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, Las Antillas Holandesas, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico, Santa Lucía y Trinidad y Tobago.
6. Sudamérica: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Guyana, Perú, Paraguay, Surinam y Uruguay.

7. Oceanía: Samoa, Australia, Islas Fiji, Polinesia Francesa, Nueva Caledonia y Nueva Zelanda.

III. Propiedades del virus tristeza de los cítricos

El CTV es un miembro del género *Closterovirus* de la familia *Closteroviridae*. Las partículas virales son filamentos largos y flexibles con 2,000 nm de longitud y de 10 a 12 nm en diámetro [1]. El CTV posee dos proteínas de cápside, una denominada proteína de cápside (CP) mayor, de 25 kDa y una denominada adyacente o menor con un peso de 27 kDa. La CP mayor cubre alrededor del 95% de las partículas virales, mientras que el 5% restante lo ocupa la CP menor, la cual se sitúa en una porción terminal de las partículas [8].

El genoma del CTV es el mayor entre los virus de plantas estudiados; está compuesto por RNA de cadena sencilla de sentido positivo [9]. La información disponible sobre la secuenciación RNA genómico del CTV para varios aislamientos con propiedades biológicas diferentes y de diversos orígenes geográficos indica que su genoma oscila de 19226 a 19306 nucleotidos (nt) [10,11,12]. Tanto en su tamaño como la organización y estrategia de expresión es muy similar a los Nidovirales animales, del cual el *Coronavirus* es el causante de un síndrome agudo de respiración humana [13].

El genoma del CTV está organizado en 12 marcos de lectura abierta (MLA) que potencialmente codifican al menos para 12 proteínas [10-14]. El MLA 1a codifica

una proteína de 349 kDa que tiene dos dominios semejantes de proteasa, seguido de dominios semejantes de metil-transferasas y helicasas. El MLA 1b contiene un dominio de RNA polimerasa dependiente de RNA el cual es probable que sea expresado por un cambio de marco +1. Los MLA restantes son expresados a través de RNA mensajeros sub-genómicos coterminales (sgRNA), que se acumulan en niveles muy diferentes durante su replicación en protoplastos. Los sgRNA que codifican para las proteínas p20 y p23 se encuentran en mayor abundancia y producen una mayor cantidad de proteína que otros MLA. Sin embargo, entre los diferentes aislamientos de CTV, la proporción en abundancia para estos sgRNA es mayor en los árboles infectados [14].

En investigaciones iniciales efectuadas con el CTV se encontraron cuerpos de inclusión presentes en el floema en plantas infectadas, los cuales en su momento se emplearon con fines de diagnóstico [15]; mas recientemente, estos cuerpos de inclusión se han asociado comúnmente para infecciones por el CTV y otros *Closterovirus* [14]. Estudios de tejidos infectados por CTV han revelado la presencia de cuerpos cromogénicos en las células del parénquima en floema que se encuentran adjuntas a tamices de tubos con filamentos de masas oscurecidas o teñidas por manchas y estructuras en forma de jeringa. Tinciones con azul magenta sugieren la presencia de nucleoproteínas en dichas inclusiones. Además, las células del floema normalmente contienen una o más estructuras con contenido amorfo y estructuras típicas vesiculares, asemejando

a los virus amarillos de la remolacha BYV (*Beet yellow virus*), también clasificado como un *Closterovirus* [14].

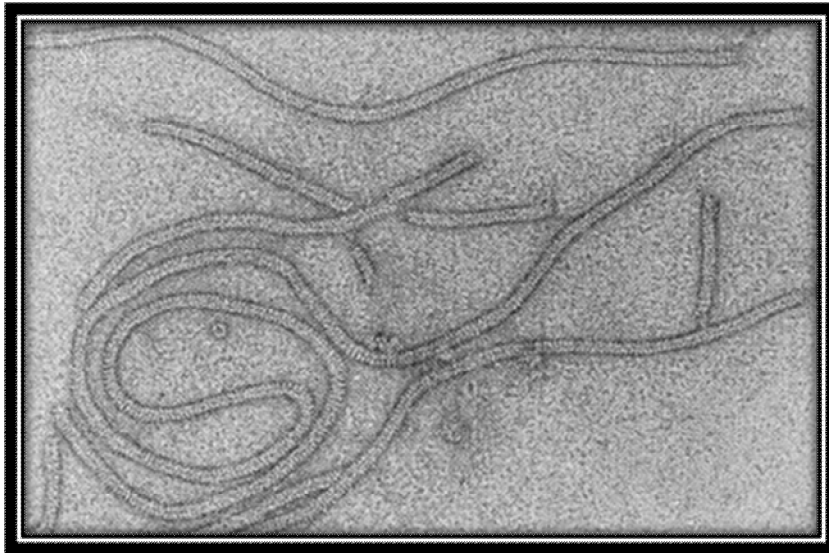


Figura 3. Virus de la Tristeza de los Cítricos. Microfotografía electrónica de partículas del virus tristeza de los cítricos, a manera de filamentos largos y flexibles de las partículas virales. [Tomado de: Citrus Tristeza Virus. In: The Universal Virus Database (2006). Columbia University, New York, USA.]

IV. Proteína p20 del virus tristeza de los cítricos

El gen p20 está compuesto por 549 bases y está ubicado en la porción proximal 3' del genoma del CTV [9] y codifica una proteína denominada p20 que contiene 182 aminoácidos con un peso molecular de 20,508 Daltons [9,14]. Se ha determinado que la proteína p20 de CTV tiene gran afinidad por si misma, lo que sugiere que sea la misma proteína la que se agrega a manera de inclusiones en un sistema *in vivo*. Todo parece indicar que, tanto por su auto-afinidad, la abundancia de los sgRNA y las observaciones citopatológicas de CTV que se han realizado, la proteína p20 tiene un rol primordial en la formación de las

inclusiones amorfas observadas en tejidos infectados, o bien, formando parte importante como componente en éstas [14].

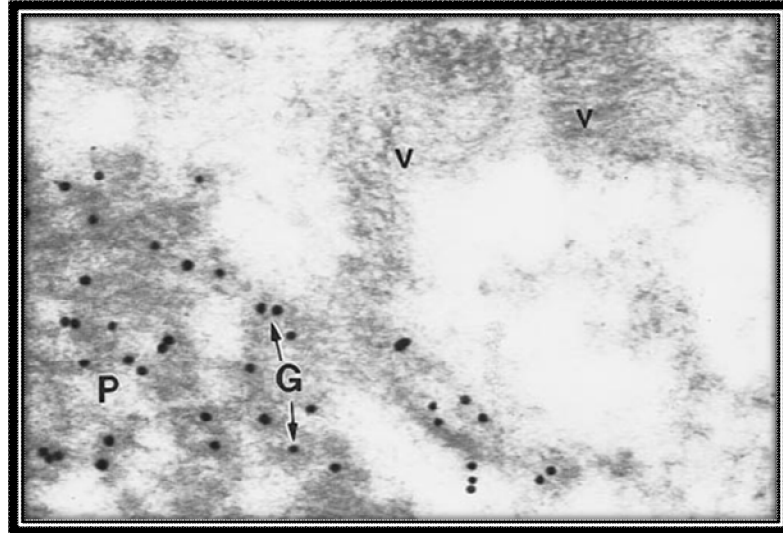


Figura 4: Fotomicrografía de tejido infectado con CTV T36. Fotomicrografía electrónica de tejido infectado con CTV T36 mostrando el cuerpo de inclusión (P) y partículas virales (v). Esta sección de tejido fue tratada con anticuerpos específicos anti-proteína p20 y visualizada con anticuerpos anti conejo marcados con oro (G). Se observa la localización de las partículas de oro en las inclusiones [9].

V. Diagnóstico del virus tristeza de los cítricos en plantas infectadas

La detección del CTV en plantas de cítricos con fines de diagnóstico, involucra varios métodos diversos, que incluyen los biológicos mediante plantas indicadoras [7], uso de microscopía de luz para observación de inclusiones virales [15], diversos métodos basados en serología mediante anticuerpos específicos disponibles comercialmente [16,17], así como varios protocolos de amplificación de secuencias específicas por PCR [18-20]. En 1996 Cevik y colaboradores [20] establecieron un método de PCR bi-direccional con base al gen p25 de la proteína de la cápside (CP) mayor para el diagnóstico diferencial de CTV, mismo que permite identificar el tipo de raza presente, ya sea de tipo débil o del tipo severa. Asimismo, Iracheta-Cárdenas y colaboradores en 2002 [21], lograron clonar y expresar la proteína estructural p25 (CP) de CTV de dos aislamientos mexicanos, misma que se empleó con éxito para la producción de anticuerpos policlonales útiles para el análisis masivo de muestras de cítricos con fines diagnóstico de infecciones por CTV a nivel de campo [22].

Si bien los métodos serológicos y moleculares antes mencionados son efectivos y precisos para detectar la presencia del CTV en plantas infectadas, éstos han sido desarrollados con base al gen p25 del CTV o de la proteína de cápside que él expresa [16-22]. Sin embargo, no se ha explorado la posibilidad de emplear otros genes, que conforman el genoma del CTV, tal como el gen p20 o su producto, con fines de detección CTV y diagnóstico de la enfermedad. Con base en lo anterior, se plantea entonces emplear el gen p20 del CTV para su

clonación y expresión en células de *Escherichia coli*, como base para la producción posterior de anticuerpos anti-p20 de CTV con fines de diagnóstico.

HIPÓTESIS

Es posible la producción de la proteína p20 del virus tristeza de los cítricos mediante clonación molecular del gen p20 a partir de tejido vegetal infectado.

JUSTIFICACIÓN

El virus tristeza en los cítricos es el agente causal de una de las enfermedades económicamente más devastadoras a nivel mundial en plantas [1-6]. La citricultura de México se considera que está en riesgo de daños futuros por el CTV, debido al predominio del portainjerto naranjo agrio en la mayor parte de la citricultura, por la presencia demostrada del virus en sus plantaciones y por la presencia del vector más eficiente *Toxoptera citricida* [2]. No obstante que la detección del virus en las plantaciones se lleva a cabo en forma rutinaria mediante anticuerpos específicos, la disponibilidad de los estuches serológicos comerciales de detección en ocasiones no es inmediata [17]; asimismo, existe la posibilidad de diseñar nuevas estrategias de detección mediante el desarrollo de métodos basados en la proteína recombinante para genes distintos al p25 de uso común en los métodos de detección actualmente disponibles para el CTV.

OBJETIVO GENERAL

Generar la proteína p20 del virus tristeza de los cítricos mediante técnicas de DNA recombinante.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ✓ Aplicar un método de extracción de RNA viral a partir de muestras infectadas por CTV.
- ✓ Obtener el DNA complementario mediante Retro-Transcripción para el gen p20 de CTV.
- ✓ Amplificar el cDNA de p20 mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa.
- ✓ Transformación de una cepa de *E. coli* productora de la proteína p20 de CTV.
- ✓ Obtener la secuencia del gen p20 amplificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Recolección de muestras de tejido vegetal

Las muestras analizadas en el presente estudio fueron de cuatro orígenes distintos. 1. Tres muestras de tejido desecado infectado con los aislamientos T36, T66 y T55 de Florida como controles positivos; las muestras T36 y T66 representan aislamientos de tipo severo, mientras que la muestra T55 representa aislamientos del tipo débil [23,24]. 2. Siete muestras con aislamientos originalmente obtenidos a partir de plantas de naranjo en huertas comerciales de Nuevo León, pero mantenidos en cultivos *in planta* en por lo menos dos plantas de limón mexicano (*C. aurantifolia*) a nivel de invernadero [25]. 3. Dos muestras del aislamiento original obtenido en Güemez, Tamaulipas [26], mantenido también en plantas de limón mexicano a nivel de invernadero. 4. Cuatro muestras de árboles de naranjo colectadas en una huerta comercial en General Terán, Nuevo León. El transporte y almacenamiento del material de estudio se hizo en condiciones de refrigeración. Posteriormente, se lavaron, fragmentaron en porciones de alrededor de 2-3 mm y se almacenaron a -20 °C hasta el momento de su análisis. En la Tabla 1 se hace un resumen de las muestras analizadas.

Tabla 1. Resumen de información de la colección de muestras de tejido de árboles de cítricos con diagnóstico positivo para CTV.

Muestra No.	Clave	Origen
1	MX14	Guémez, Tamaulipas, México
2	CIEFV	Guémez, Tamaulipas, México
3	4038 L-8 A3	Linares, Nuevo León, México
4	4028 L-1 A11	Linares, Nuevo León, México
5	4038 L5 A-4	Linares, Nuevo León, México
6	166 L38 A8	Montemorelos, Nuevo León, México
7	166 L23 A10	Montemorelos, Nuevo León, México
8	T166 L23 A10	Montemorelos, Nuevo León, México
9	T166 L26-1 A11	Montemorelos, Nuevo León, México
10	T36	Florida (EEUU)
11	T55	Florida (EEUU)
12	T66	Florida (EEUU)
13	Anacuitas A2	General Terán, Nuevo León, México
14	Anacuitas A27 (2)	General Terán, Nuevo León, México
15	Anacuitas A10 (3)	General Terán, Nuevo León, México
16	Anacuitas A11 Nte	General Terán, Nuevo León, México

II. Extracción de RNA del virus tristeza de los cítricos

El proceso de extracción de RNA se llevó a cabo para cada una de las muestras de tejido infectado por separado. El proceso de disminución del tamaño de partícula y la destrucción de las estructuras celulares vegetales, a fin de liberar los ácidos nucleicos, se realizó mediante maceración de la muestra en mortero adicionando nitrógeno líquido. Tanto el proceso de maceración como el de extracción de RNA se llevaron a cabo en un área reservada y tratada con agentes oxidantes para eliminar la presencia de RNAsas.

La extracción de RNA se realizó mediante el Sistema de Aislamiento de RNA Total de Promega [27]. Este sistema provee de una técnica rápida y simple para la preparación de RNA puro e intacto de células en cultivo y de tejidos blandos y rígidos. El sistema cuenta con un procedimiento de tratamiento de DNAasa, el cual está diseñado para reducir la contaminación de DNA genómico, mismo que puede interferir con metodologías basadas en su amplificación. La purificación se logra sin el uso de las precipitaciones con etanol o fenol/cloroformo y no hay acarreo de DNAasas en la preparación final del RNA. Se pesaron 30 mg de tejido macerado en un tubo de microcentrífuga esterilizado y libre de RNAsas. Se añadió buffer de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 350 μ L del buffer de dilución de RNA, el cual fue previamente calentado a 70°C por 3 minutos y se mezcló por inmersión. Las muestras se llevaron a centrifugación a 14,000 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se pasó a un tubo de microcentrífuga estéril, al cual se le añadieron 200 μ L de etanol absoluto y se mezcló repetidamente con pipeta.

La mezcla fue transferida al aditamento con membrana para adsorción de ácidos nucleicos y fue centrifugada por 1 minuto a 14,000 rpm, el filtrado fue desechado y se agregaron 50 μ L de mezcla de incubación de DNAasa (40 μ L de buffer de DNAasa, 5 μ L de $MnCl_2$ 0.09M y 5 μ L de DNAasa I), y se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el período de incubación fueron agregados 200 μ L de la solución de *DNAasa stop* y se centrifugó por 1 minuto a 14,000 rpm. Se hicieron dos lavados con la solución de lavado de RNA, en el

primero se añadieron 600 μL y en el segundo 250 μL , centrifugando durante 1 minuto entre cada uno de ellos a 14,000 rpm. Por último, se eluyeron cada una de las muestras de RNA agregando 100 μL de agua libre de nucleasas a la membrana de adsorción y se centrifugó por 1 minuto a 14,000 rpm. Las muestras se almacenaron a -70°C .

III. Obtención de DNA complementario para la proteína p20 de CTV

i) **Diseño de iniciadores:** Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar la secuencia que codifica la proteína p20 de CTV, utilizando para ello la secuencia reportada para la cepa de referencia (T36). En el diseño de los iniciadores se consideró incluir el codón de inicio de la transcripción (ATG) para el segmento amplificado de 5' a 3' (iniciador derecho). Así mismo, el iniciador que amplifica el segmento de 3' a 5' (iniciador reverso) incluye el codón de terminación de la transcripción (ATC). Las secuencias de ambos iniciadores amplifican un producto esperado de 549 pares de bases (Tabla 2).

Tabla 2. Secuencia de iniciadores empleados en amplificación del cDNA del gen de la proteína p20 de CTV.

Iniciadores	Secuencia 5' a 3'	Amplicón*
Iniciador derecho	5'-atgcgagcttacttttagtggt-3'	549 pb
Iniciador reverso	5'-ctacacgcaagatggagaga-3'	

*Tamaño esperado en pares de bases

ii) Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa:

Para llevar a cabo la obtención de las primeras moléculas de DNA correspondientes al cDNA de la proteína p20 de CTV se pusieron en marcha reacciones de Retro-transcripción acopladas a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Para este propósito se utilizaron componentes del Sistema de RT-PCR *Access Quick System* de Promega [28]. Este sistema permite hacer uso de una mezcla cocktail con doble concentración (2X) de los componentes constante en una reacción de este tipo (*Tfl* DNA polimerasa, Sales, Mg^{+2} y dNTPs). Los componentes variables tales como: iniciadores, RNA, enzima AMV Retro-transcriptasa y agua libre de nucleasas se utilizaron tal como se indica en la Tabla 3. Todas las reacciones, tanto muestras como blancos, se llevaron a cabo en un volumen de 50 μ L.

Tabla 3. Componentes de Retro-transcripción acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Componente	Concentración	Volúmen
Mezcla coctel	2x	25 μ L
Iniciador derecho	5 μ M	5 μ L
Iniciador reverso	5 μ M	5 μ L
RNA	N/D	5 μ L
Agua	—	9 μ L
AMV Enzima Retro-transcriptasa	5 U/ μ L	1 μ L

Una vez hechas las diluciones apropiadas para cada muestra se sometieron al desarrollo de los ciclos de temperatura en un Termociclador de Gradientes (*Eppendorff Mod. Ep Gradient*). Los ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a las etapas de RT y PCR se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Ciclos de temperaturas y tiempos correspondientes a las etapas de Retro-transcripción acopladas a la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Etapa	Temperatura/tiempo	Ciclos
RT	40°C/45 min.	1
PCR	95°C/2 min.	1
	95°C/45 seg.	10
	51°C/45 seg.	
	72°C/1 min.	
	72°C/5 min.	1

Para confirmar la amplificación de DNA se analizaron todas las muestras mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v). Una vez revelado el resultado de la RT-PCR, se seleccionó la muestra con mejor resolución de la banda de amplificación para continuar con los procesos de amplificación de inserto por PCR con fines de clonación molecular en un vector plasmídico, y transformación de *Escherichia coli* como vehículo de expresión de la proteína p20 de CTV.

iii) Estandarización de condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa: Los siguientes procedimientos se realizaron solamente para una de las muestras obtenidas de la RT-PCR. Se seleccionó aquella que además de presentar un amplicón correspondiente al tamaño esperado, tuviera también una banda clara y bien definida una vez revelada la electroforesis en gel de agarosa.

Se determinaron las condiciones óptimas para la temperatura de alineamiento de los iniciadores a fin de obtener mediante PCR el DNA complementario con características ideales. Se llevaron a cabo amplificaciones en gradientes de temperatura de 50 a 65°C. En esta fase del proceso se utilizó una enzima DNA polimerasa (*Taq* polimerasa) de alta fidelidad (Roche). La composición de cada uno de los tubos de reacción se presenta en la Tabla 5.

El DNA empleado como templete pertenece a la muestra del aislamiento designado como MX14. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) para confirmar la amplificación. El amplicón obtenido fue purificado con 50µL de acetato de amonio 10M más 500µL de etanol absoluto, esto se centrifugó por 3 min a 14,000rpm, se decantó el sobrenadante y se agregaron 500µL de etanol al 70% (v/v), mezclándose por inmersión, se centrifugó por 3 min a 14,000rpm y se colocó el tubo abierto cerca del

mechero para secarlo, por último se resuspendió el DNA precipitado en 50µL de agua estéril. Se almacenó a -70°C.

Tabla 5. Componentes Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Componente	Concentración	Volumen
Buffer	5x	10µL
Iniciador derecho	5µM	5 µL
Iniciador reverso	5 µM	5 µL
DNA	N/D	2 µL
dNTP´s	10 mM c/u	1µL
MgCl ₂	25 mM	4µL
<i>Taq</i> DNA Polimerasa	5 U/ µL	0.25 µL
Agua	cbp	50 µL

IV. Clonación molecular del gen de la proteína p20 de CTV

Esta fase del proceso se realizó mediante la ligación del cDNA de la proteína p20 con el vector plasmídico pGEM-T de Promega [29] y una transformación con células calcio-competentes utilizando las cepas de *E. coli* JM109 y *E. coli* HB101. Debido a que la *Taq* DNA polimerasa elegida es una enzima que genera productos de PCR con residuos de Adenina (A) como nucleótido 3' no complementario en la doble hebra, el amplicón obtenido tiene terminaciones 3'-A en ambos extremos.

El producto de PCR obtenido se presenta esquematizado en la Figura 5. Lo anterior hace posible el empleo del plásmido p-GEM-T, definido como un vector para clonación de productos de PCR.

Este nucleótido terminación 3' -T se encuentra sobresaliente de forma no complementaria en el sitio de inserción, mejorando la eficiencia de la ligación. El vector plasmídico p-GEM-T se presenta esquematizado en la Figura 6.

El plásmido p-GEM-T contiene los promotores de la RNA polimerasa de los fagos T7 y SP6 ofreciendo una región múltiple de clonación dentro de la región α -péptido que codifica a la enzima β -galactosidasa. La inactivación por inserción del α -péptido permite que las clonas recombinantes sean directamente identificadas por selección de color en placas con indicadores [29].

i) **Reacción de Ligación:** Para la reacción de ligación se utilizó un volumen total de 10 μ L. Como control positivo se utilizaron las mismas condiciones sustituyendo el cDNA (MX14) por un control de inserto de DNA [30], igualmente para el control negativo pero omitiendo la adición de DNA. La composición de la reacción de ligación se presenta en la Tabla 6. Las reacciones se mezclaron con pipeta y se incubaron por 1h a temperatura ambiente. Se ensayaron tres diferentes proporciones de la combinación Vector:Plásmido (1:1; 2:1 y 3:1).

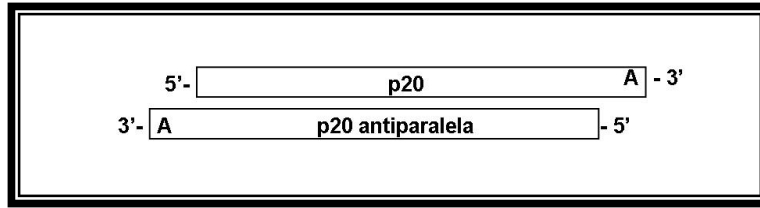


Figura 5. Esquema del cDNA de la proteína p20 de CTV obtenido mediante PCR. Se representan los extremos de A-3' no apareados que permiten que el inserte sea ligado de manera específica con vectores plasmídicos con extremos T-3'.

Este vector es preparado cortando con la enzima de restricción Eco RV y añadiendo una Timina (T) en el extremo 3' obteniendo terminaciones 3'- T a ambos extremos.

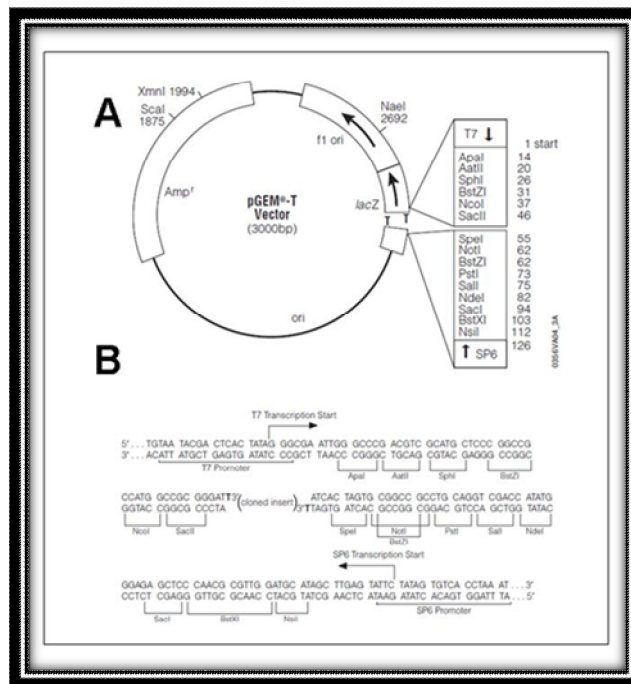


Figura 6. Esquema del vector plasmídico p-GEM-T. A) Mapa del plásmido p-GEM-T, se presentan esquematizados los promotores SP6 y T7, dianas de restricción de las enzimas indicadas en el sitio de poli-clonaje y el marcador de selección de resistencia a ampicilina. B) Diagrama detallado de las secuencias involucradas en el sitio de poli-clonaje que interrumpe a *lacZ*.

Tabla 6. Componentes de la reacción de ligación.

Componente	Concentración	Volumen
Buffer	2x	5µL
DNA	N/D	2 µL
pGEM-T	50 ng/µL	1µL
T4 DNA Ligasa	10 U/ µL	0.25 µL
Agua	cbp	10 µL

- ii) **Transformación de *E. coli*:** En el proceso de transformación bacteriana se utilizaron las cepas *E. coli* JM109 y *E. coli* HB101 como vehículos de expresión de la proteína p20 de CTV. Se prepararon lotes de células calcio-competentes de ambas cepas según Sambrook y Russell [31].

Las células se resuspendieron en 100µL de CaCl₂ 100mM y se agregaron los 10µL del producto de ligación pGEM-p20, de manera simultanea se llevaron un blanco y un control de ligación. Una vez mezcladas las células competentes y el plásmido se incubaron en baño de hielo durante 30 minutos con una agitación suave cada 5 minutos. Al pasar el período de incubación se realizó un choque térmico en baño de agua a 42 °C durante 90 seg. e inmediatamente se colocaron los tubos en baño de hielo por 2 minutos. Posteriormente se agregaron 900µL de medio LB y se incubó a 37 °C por 45 minutos en agitación 100 rpm. Una vez transcurrido este tiempo,

las muestras y los controles se centrifugaron a 4100 rpm por 1 min, se desecharon 800 μ L del sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en el volumen restante. Las muestras, el control con inserto y el control negativo se sembraron en cajas Petri de Agar LB con ampicilina 50 mg/mL, 20 μ L de X-gal 50mg/mL y 100 μ L de IPTG 100mM, el control negativo también se sembró en placa con LB sin marcadores de selección. Las placas de agar fueron incubadas a 37 °C por 24 horas y una vez cumplido este tiempo, se seleccionaron y ordenaron las colonias que presentaran ausencia de coloración azul debida a la transformación del X-gal, en nuevas placas de Agar LB con ampicilina.

iii) Confirmación de la clonación del gen de la proteína p20 de CTV:

Primeramente se comprobó la presencia del inserto mediante la prueba de la β -galactosidasa de las primeras 30 colonias de las clonas resultantes del proceso de transformación de las cepas HB101 y JM109 de *E. coli*. Para continuar con este proceso de cribado se realizó una extracción y purificación de DNA plasmídico con la técnica de lisis alcalina de las primeras ocho clonas de cada una de las cepas transformadas de *E. coli* con ausencia de actividad β -galactosidasa.

Se utilizaron las células crecidas en medio LB/amp 50mg/mL de las cepas transformadas con una densidad óptica aproximada de 0.600. Se tomó 1mL de ambos cultivos en tubos de microcentrífuga estériles y se centrifugaron

las suspensiones celulares a 8,000 rpm por 3 min. Se decantó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 100µL de la solución de lisis I, se agregaron 250µL de la solución de lisis II, se mezcló por inversión y se añadió la solución de lisis III. Se mezcló por inversión y se centrifugaron las muestras a 8,000rpm por 3 min. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se agregó un volumen de isopropanol. Se mezcló por inversión hasta homogenizar y se centrifugó a 14,000rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante. El precipitado se lavó con 500µL de etanol al 70% (v/v) y se volvieron a centrifugar las muestras en las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente. Por último, se disolvió la pastilla de DNA en 50µL de agua estéril.

Posteriormente se confirmó mediante PCR la presencia de la secuencia del gen de la proteína p20 de CTV, para las 8 clonas transformantes extraídas y purificadas de *E. coli* JM109 y HB101. Esta amplificación se llevó a cabo con las mismas condiciones previamente descritas en la tabla 5. Se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v) para confirmar la amplificación.

V. Producción de la proteína p20 recombinante

En este proceso se seleccionaron las siete primeras clonas recombinantes de *E. coli* JM109 y HB101 para su inoculación en matraz. Para ello se empleó el medio de cultivo LB con ampicilina 50mg/mL, permitiendo el crecimiento de las células en un periodo de 12 h a 37°C a 100 rpm. La inducción de expresión proteica se llevó a cabo mediante la adición de IPTG 1mM o lactosa 100mM. El momento de la adición de estos compuestos se denominó la hora 0.

i) **Inducción de la expresión de la proteína p20:** Se tomaron alícuotas de 2mL de cada una de las preparaciones (IPTG o lactosa) a las 8, 24, 48 y 72 h de la fermentación. El cultivo de las alícuotas tomadas se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos y se decantó el sobrenadante. Las muestras tomadas fueron mezcladas en el mismo volumen del paquete celular con un volumen del buffer de lisis (0.5mL agua, 2.5mL Tris pH 6.8 1M, 4mL SDS 10% v/v, 2mL de glicerol, 1mL β -mercaptoetanol), se calentaron a 100°C en baño de agua por 5 min. La identificación de la proteína se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y condiciones desnaturizantes al 15% (SDS-PAGE) y los geles fueron teñidos siguiendo la metodología con azul de Coomassie según Sambrook y Russell [31].

VI. Verificación de la expresión de la proteína p20 recombinante

La expresión de la proteína p20 recombinante en *E. coli* se llevó a cabo mediante la técnica de Western blot. Las cepas transformadas empleadas fueron de la 1 a la 7 de HB101, y de la 1 a 7 de JM109, crecidas en medio *Magic Media*, (Invitrogen) (Apéndice); asimismo, se empleó tejido de cítricos infectado por CTV. Primeramente se realizaron electroforesis de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), seguida de electro-transferencia a membranas de nitrocelulosa. Las membranas transferidas se tiñeron con Ponceu 0.01% (m/v) y se destiñeron con agua. El filtro se lavo en TBS 1x y se sumergió dos veces en tween 20 0.05% (TBS 1x v/v) durante 10 min, después se colocó en tween 20, 2% (TBS 1x v/v) por 10 min y se lavó dos veces con TBS 1x durante 5 min. Seguido del lavado se adicionó el anticuerpo primario anti-p20 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en agitación suave. Pasado el tiempo de incubación se lavo dos veces con Tween 20, 0.05% (TBS 1x v/v) durante 5 min, se adicionó el anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo comercial acoplado a fosfatasa alcalina y se incubó por 45 min en agitación suave. Después de la incubación se lavó dos veces de nuevo con TBS 1x por 5min. Por último se agregaron 500µL de solución cromogénica BCIP/NBT, se dejó hasta que aparecieron bandas color azul, se hizo un lavado con agua bidestilada y el filtro se colocó entre dos piezas de papel secante.

VII. Secuenciación del gen p20 del CTV

El inserto clonado en el plásmido pGEM-T correspondiente al aislamiento MX14 del gen p20 de CTV se sometió a secuenciación nucleotídica. Para ello se aplicó secuenciación basada en el método de Sanger de los fragmentos amplificados y purificados de PCR en un secuenciador automático de AppliedBiosystems Modelo: 3730. La amplificación de los insertos se llevó a cabo en las mismas condiciones que se indican en la tabla 5 del apartado, para la obtención del DNA complementario de la proteína p20. Las muestras se purificaron mediante aplicación de los sistemas de purificación para productos de PCR (Amicon Ultra, Millipore), con el propósito de remover componentes que pudieran interferir con el método de secuenciación aplicado, tales como: sales de buffer, iniciadores o nucleótidos no incorporados, enzima, etc. El DNA recuperado fue resuspendido en agua libre de nucleadas (Roche) ajustando a una concentración de 50 ng/μl. Ambos iniciadores se emplearon en el proceso de secuenciación a una concentración de 3.2 pmoles. La secuencia nucleotídica resultante se comparó en línea con la secuencia de referencia (T36) en la base de datos del Centro Nacional para la Investigación en Biotecnología (www.ncbi.nih.gov) del Instituto Nacional de Salud (EE.UU.), con el propósito de establecer el porcentaje de homología entre ambas secuencias.

RESULTADOS

I. Recolección de muestras de tejido vegetal

Las muestras de cítricos empleadas en el desarrollo experimental del presente trabajo de tesis fueron diagnosticadas como infectadas por CTV mediante serología detectando la proteína p25 (Tabla 7).

Tabla 7. Muestras de tejido de árboles de cítricos con diagnóstico positivo para CTV mediante serología con anticuerpos anti-p25.

Muestra No.	Clave	Serología Anti-p25	Diagnóstico para el CTV
1	MX14	+	+
2	CIEFV	+	+
3	4038 L-8 A3	+	+
4	4028 L-1 A11	+	+
5	4038 L5 A-4	+	+
6	166 L38 A8	+	+
7	166 L23 A10	+	+
8	T166 L23 A10	+	+
9	T166 L26-1 A11	+	+
10	T36	+	+
11	T55	+	+
12	T66	+	+
13	Anacuitas A2	+	+
14	Anacuitas A27 (2)	+	+
15	Anacuitas A10 (3)	+	+
16	Anacuitas A11 Nte	+	+

II. Extracción de RNA del virus tristeza de los cítricos

Se obtuvo RNA total de cada una de las muestras sometidas al proceso de extracción. El método de extracción aplicado fue el recomendado por el fabricante del kit comercial empleado [26], solo añadiendo un paso previo en la preparación de la muestra del tejido vegetal, que involucra como ya fue descrito en el capítulo anterior, maceración en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Este solo paso hizo posible una mayor fragmentación del tejido vegetal, probablemente exponiendo a las células a una lisis más efectiva por efecto de las soluciones empleadas para este propósito. De modo que se obtuvo RNA a partir de cada una de las muestras de tejido vegetal infectado. De estas mismas muestras fueron tomados 5 μ L de cada una de ellas para ser usadas directamente como template para obtener el cDNA correspondiente en las reacciones de retrotranscripción. El resto del volumen de cada extracción fue dividido en 3 alícuotas y almacenadas a -70 °C.

III. Obtención de DNA complementario para la proteína p20 de CTV

- i)* **Retro-transcripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa:** Las reacciones de RT-PCR para las muestras MX14, 4038 L-8 A3, 4028 L-1 A 11, 166L38 A8, T166 L23 A10, T 36, T 55, T66 y Anacuitas mostraron un producto de amplificación en el gel de agarosa de los productos de amplificación de aproximadamente 550 pb. Los productos de amplificación para cada una de las muestras se pueden apreciar en la

Figura 7. El tamaño del amplicón es similar de 549 pb reportado para el gen p20 del CTV [14]. No fue posible amplificar el fragmento por RT-PCR para las muestras restantes en las condiciones ensayadas. Sin embargo, se ensayaron otras condiciones, incluyendo concentración de RNA, gradientes de temperaturas de alineamiento de iniciadores, e incluso extracción de RNA con mayor cantidad de muestra de tejido vegetal.

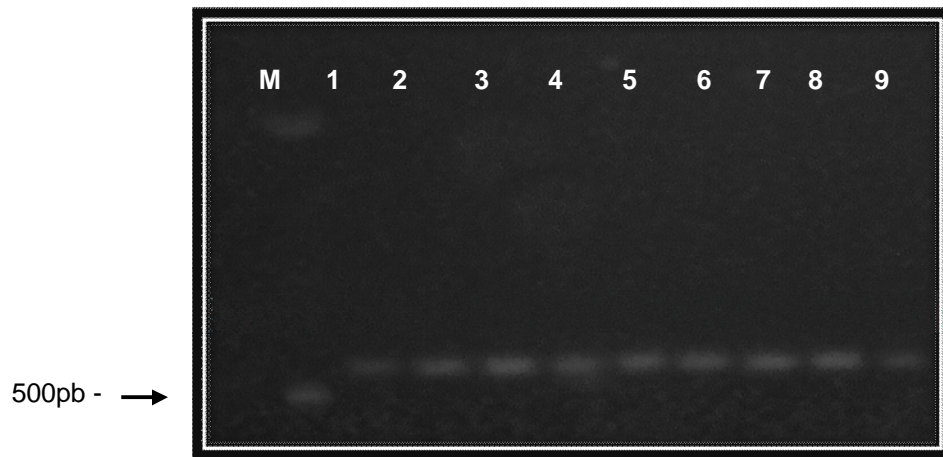


Figura 7. Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v de la RT-PCR para el gen de la proteína p20. M. marcador de peso molecular n3232s de New England Biolabs. 1. Muestra MX14, 2. 4038 L-8 A3, 3. 4028 L-1 A 11, 4. 166L38 A8, 5. T166 L23 A10, 6. T 36, 7. T 55, 8. T66 y 9. Anacuitas.

- ii)* **Estandarización de condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa:** Se seleccionó el cDNA obtenido de la RT-PCR de la muestra MX14. Según la intensidad y definición de la banda de la electroforesis realizada en gel de agarosa mostrado en la Figura 8, la temperatura óptima de alineamiento para los iniciadores en la PCR se fijó en 62 °C.

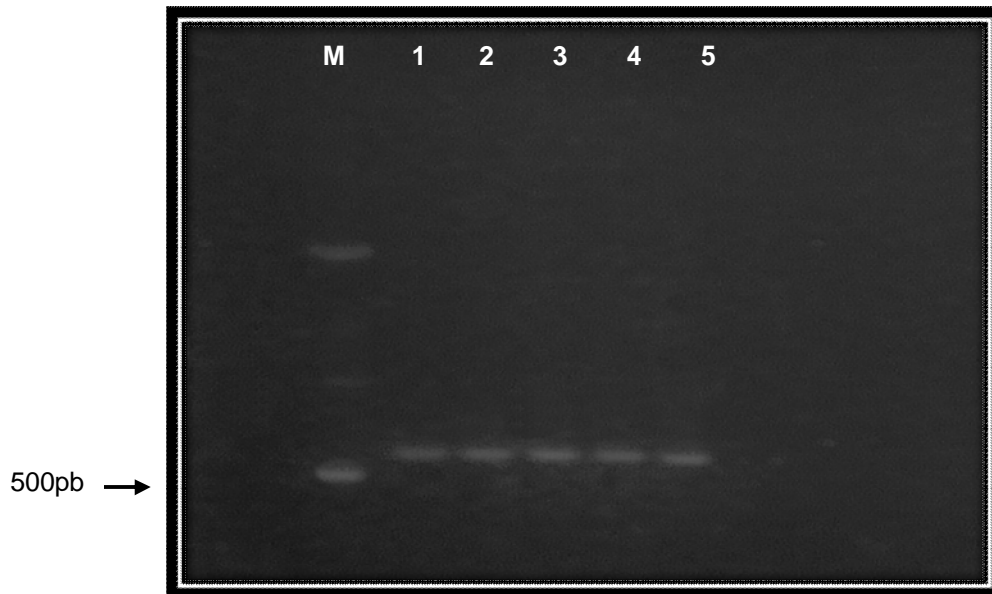


Figura 8: Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v) de la PCR para el gen de la proteína p20 de la muestra Mx14. M. marcador de peso molecular n3232s de New England Biolabs. 1. Temperatura 58 °C. 2. Temperatura 60 °C. 3. Temperatura 62 °C. 4. Temperatura 64 °C. 5. Temperatura 66 °C.

IV. Clonación molecular del gen de la proteína p20 de CTV

- i) **Transformación de *E. coli*:** Se seleccionaron 75 colonias transformantes con la cepa de *E. coli* JM109 y el producto de ligación entre el plásmido pGEM-T con el producto de amplificación purificado de p20. De la cepa *E. coli* HB101 se eligieron 23 colonias transformantes con el producto de ligación entre el plásmido pGEM-T con el producto de amplificación purificado del gen p20. En la Figura 9 se ilustra un ejemplo del crecimiento bacterial de las clonas transformadas.

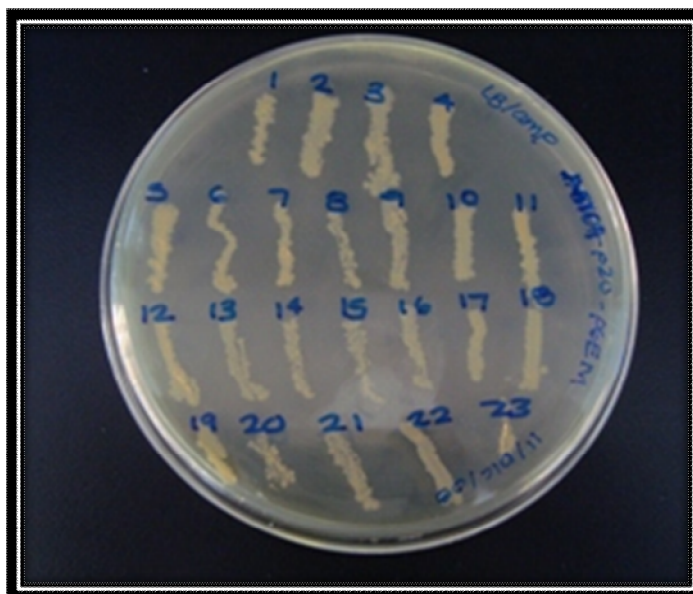


Figura 9: Colonias 1-23 transformadas con la cepa de *E. coli* HB101 y el producto de ligación del plásmido pGEM con el producto de amplificación p20 purificado de CTV.

- ii) **Confirmación de la clonación del gen de la proteína p20 de CTV:** En la prueba de actividad de la β -galactosidasa se utilizó como control negativo una colonia transformada con el plásmido pGEM sin la secuencia codificante para la p20 con la cepa de *E. coli* JM109, el cual reveló un color azul brillante, indicando la activación transcripcional de lacZ para la actividad de la β -galactosidasa (Figura 10). Las clonas de la 1-30 transformadas entre pGEM con el producto de amplificación de la secuencia de la p20 y la cepa de *E. coli* JM109, revelaron un color blanco sólido indicando que la actividad de β -galactosidasa se detiene por la inactivación transcripcional de lacZ al momento de la ligación entre el plásmido y la secuencia de la p20.

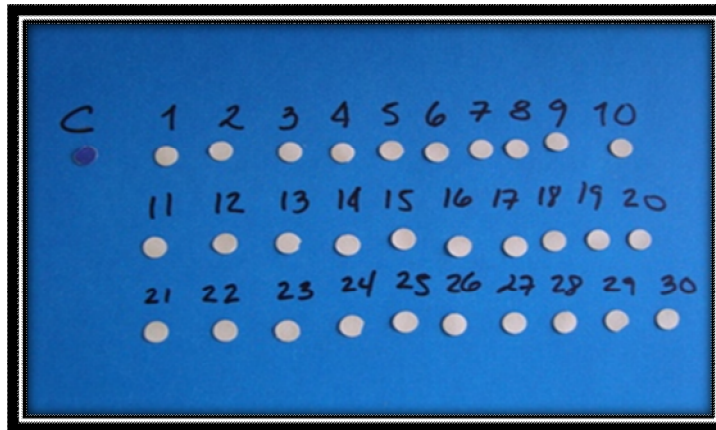


Figura 10. Prueba de la actividad de β -galactosidasa. C. Control negativo clona transformante entre *E. coli* JM109 y plásmido pGEM sin producto de amplificación de la secuencia de la proteína p20, 1-30. Clonas transformantes entre *E. coli* JM109 y plásmido pGEM con producto de amplificación purificado de la secuencia de la proteína p20.

En la comprobación realizada por PCR para las primeras 8 colonias transformantes entre pGEM con p20 y la cepa de *E. coli* JM109 se obtuvo una banda en el gel de agarosa al 1% ligeramente por debajo de la banda de 564 pb del marcador de peso molecular de Roche DNA Molecular Weight Marker III, mostrando en el gel los productos de amplificación de aproximadamente 550pb obtenidos con clonas transformantes (Figura 11). En la Figura 12 se observa la otra comprobación realizada por PCR para las primeras 8 colonias transformantes entre pGEM con p20 y la cepa de *E. coli* HB101; también se obtuvieron productos de amplificación de alrededor de 550pb.

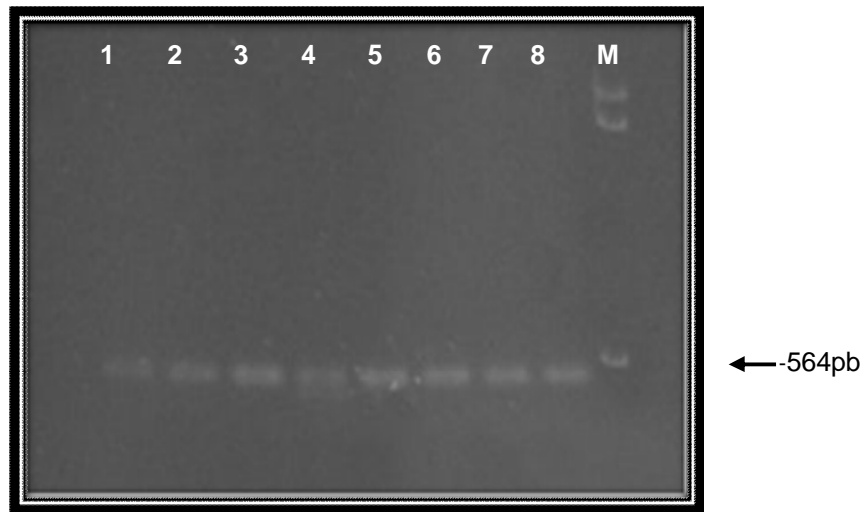


Figura 11: Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína p20. M. marcador de peso molecular de Roche DNA Molecular Weight Marker III. 1-8. Clonas transformantes entre *E. coli* JM109 y pGEM con secuencia codificante purificada para la proteína p20 del CTV.

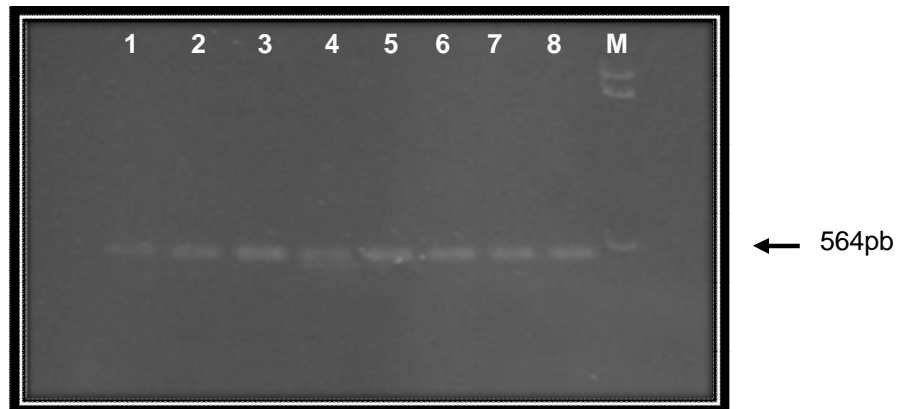


Figura 12. Productos de amplificación en gel de agarosa 1% (m/v) de la PCR para las clonas transformantes con el gen de la proteína p20. M. marcador de peso molecular de Roche DNA Molecular Weight Marker III. 1-8. Clonas transformantes entre *E. coli* HB101 y pGEM con secuencia codificante purificada para la proteína p20 del CTV.

V. Producción de la proteína p20 recombinante.

Las pruebas de expresión a las 72h con inducción de los cultivos bacterianos transformados con p20 para las clonas 1-7 con *E. coli* HB101, se observó un proteína con un peso molecular estimado de entre 16.8 y 19.2 kDa consistente en todos las clonas inducidas ya sea con lactosa o IPTG, la cual estaba ausente en las clonas donde no hubo inducción (Figuras 13 y 14).

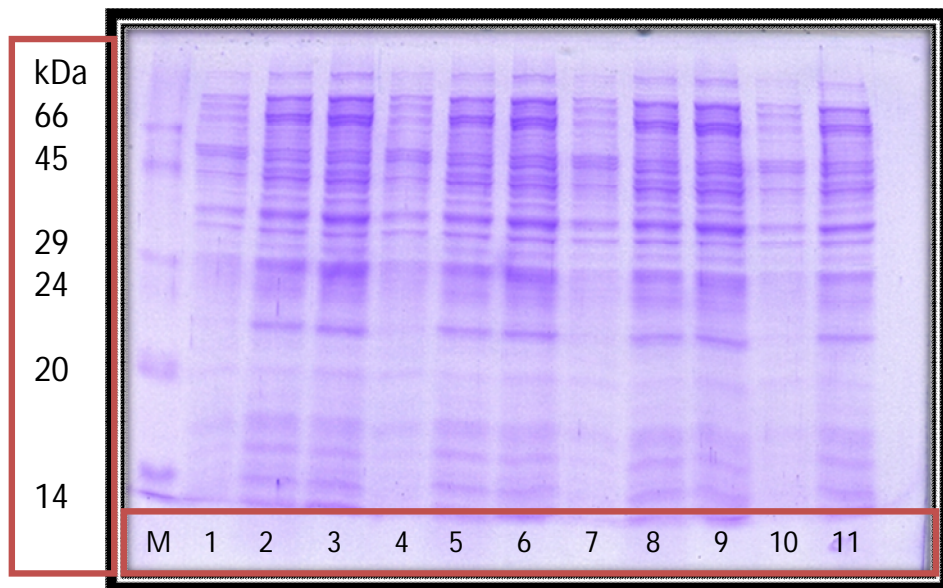


Figura 13. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%. M. Marcador de peso molecular. 1 a 3. Clona 1 *E. coli* HB101 recombinante, 4 a 6. Clona 2, 7 a 9. Clona 3, sin inducción, con lactosa e IPTG como inductores, respectivamente, 10 a 11. Clona 4 sin inducción y con lactosa como inductor, respectivamente

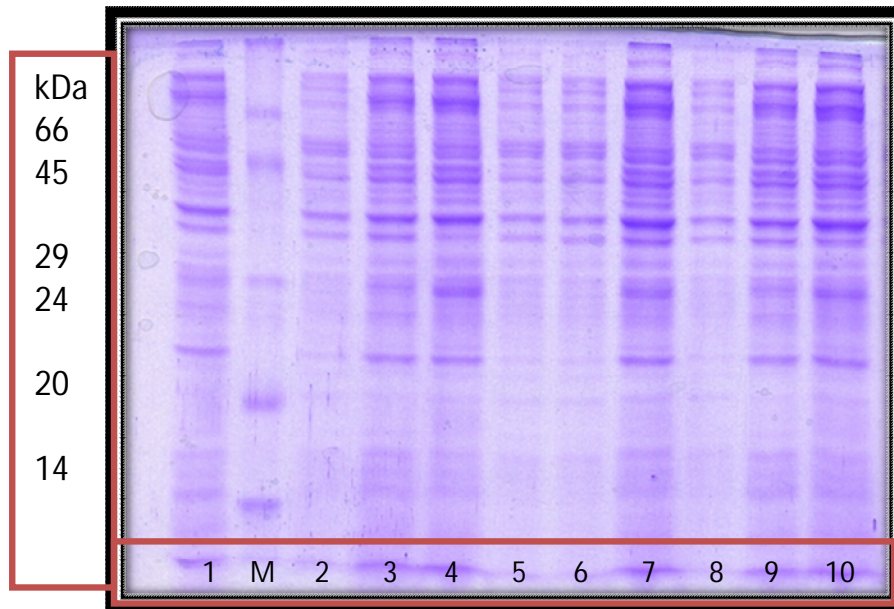


Figura 14. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%. M. Marcador de peso molecular, 1. Clona 4 *E. coli* HB101 recombinante con IPTG de inductor, 2 a 4. Clona 5, 5 a 7. Clona 6, 8 a 10. Clona 7 *E. coli* HB101 recombinante sin inducción, con lactosa e IPTG como inductores, respectivamente.

Con base en los resultados obtenidos, fue evidente que la expresión de la proteína p20 no fue de manera abundante. Lo anterior, no obstante que existen reportes que los RNA's subgenómicos que codifican para la proteína p20 *in situ* se producen en mayor abundancia con la subsecuente acumulación de la p20 en plantas infectadas por el CTV [14].

En la Figura 15 se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% con una muestra de tejido sano como control, una muestra de tejido vegetal infectado de CTV, las clonas 1-3 de *E. coli* HB101, las clonas 1-3 de *E. coli* JM109, las cepas de JM109, HB101 sin transformar y como control positivo la clona 3 de HB101 de *E. coli* recombinante.

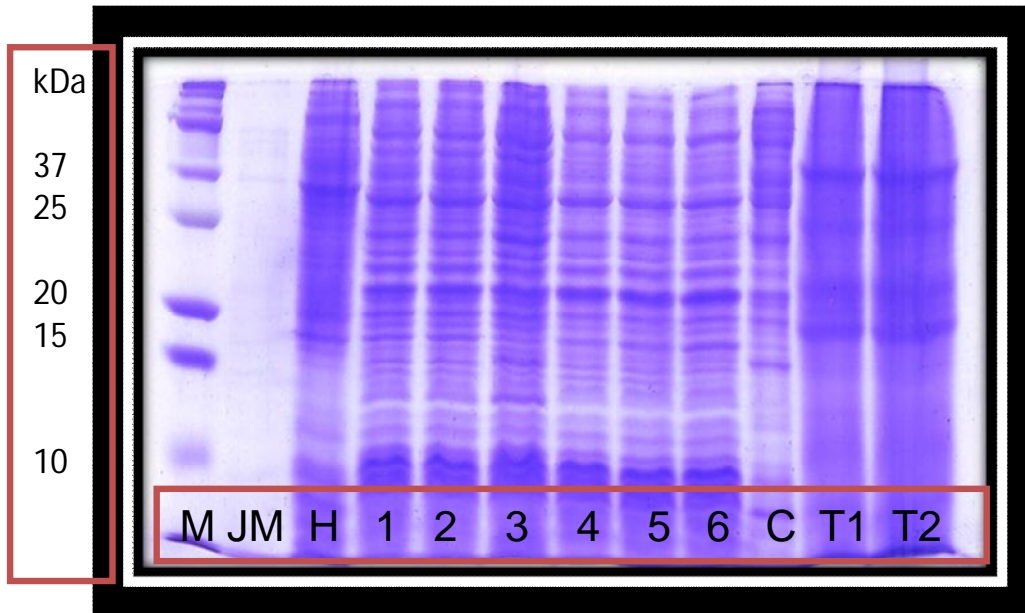


Figura 15. Expresión de la proteína p20 del CTV. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15%. M. Marcador de peso molecular. 1. Clona 1, 2. Clona 2 Clona 3, *E. coli* JM109 recombinante, 4. Clona 1, 5. Clona 2, 6. Clona 3, *E. coli* HB101 recombinante, H. *E. coli* HB101 sin transformar, JM. *E. coli* JM109 sin transformar, C. Control positivo, T1 Muestra de tejido vegetal infectado previamente diagnosticado con CTV, T2 Muestra de tejido vegetal sano.

En las Figuras 16 y 17 se muestra el proceso de la técnica *Western Blot*. En el primer paso, se observan las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa con la tinción de Ponceu 5% (Figura 16) en la cual se demuestra una transferencia eficiente ya que se pueden visualizar el perfil completo de las proteínas visualizadas en el gel teñido con azul de coomassie. En el segundo paso se muestra la inmunodetección, donde se aprecia que la IgG de conejo anti-p20, reconoce en forma específica proteínas que se encuentran en la misma zona de migración, en las clonas transformadas con el gen p20 y en la muestra de tejido infectado con el VTC, donde se visualiza intensa señal de color azul producto de la hidrólisis y precipitación de los cromógenos BCIP y NBT.

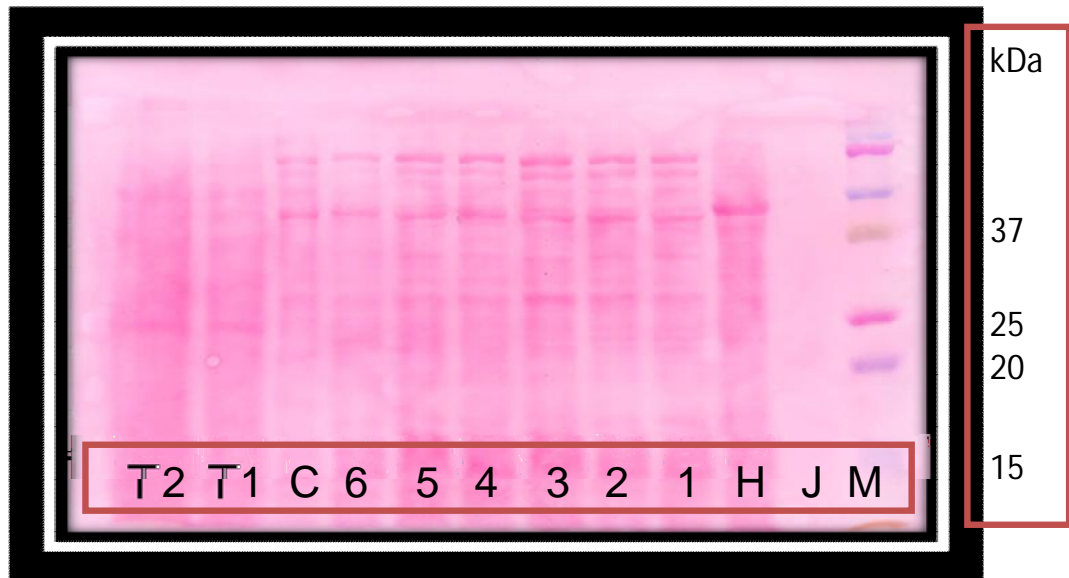


Figura 16: Membrana de nitrocelulosa teñida con Ponceu. M. Marcador de peso molecular, 1. Clona 1, 2. Clona 2, Clona 3, *E. coli* JM109 recombinante, 4. Clona 1, 5. Clona 2, 6. Clona 3, *E. coli* HB101 recombinante, H. *E. coli* HB101 sin transformar, JM. *E. coli* JM109 sin transformar, C. Control positivo, T1 Muestra de tejido vegetal infectado previamente diagnosticado con CTV, T2 Muestra de tejido vegetal sano.

Finalmente, en los controles negativos que fueron las cepas *E. coli* HB101 y JM101 sin transformar se muestra la ausencia de una señal de reconocimiento por el anticuerpo anti-p20 (Figura 18).

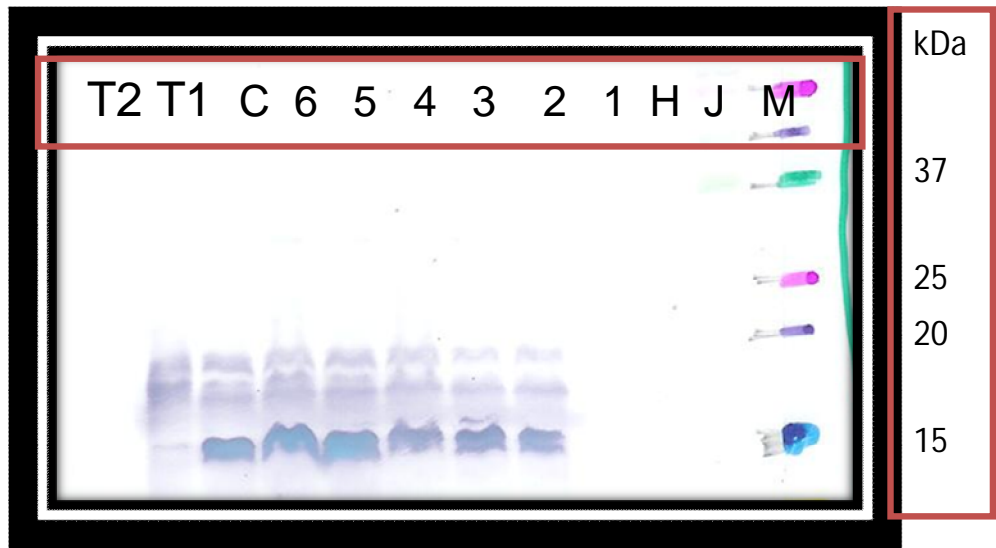


Figura 17. Inmunodetección en la membrana de nitrocelulosa transferida. M. Marcador de peso molecular, 1. Clona 1, 2. Clona 2, Clona 3, *E. coli* JM109 recombinante, 4. Clona 1, 5. Clona 2, 6. Clona 3, *E. coli* HB101 recombinante, H. *E. coli* HB101 sin transformar, JM. *E. coli* JM109 sin transformar, C. Control positivo, T1 Muestra de tejido vegetal infectado previamente diagnosticado con CTV, T2 Muestra de tejido vegetal sano.

VI. Secuenciación del gen p20 de CTV

Los resultados obtenidos de la secuenciación del gen p20 de CTV del aislamiento MX14 se presentan comparados con el aislamiento de referencia T36 en la figura 18. En total se compararon 403 nucleótidos para los cuales se establece un 89 % de homología. En el reporte se indica la coincidencia de nucleótidos de ambas secuencias comparadas con una línea vertical indicando la posición de cada una de ellas en la comparación horizontal. Los reportes adicionales sobre los resultados obtenidos de la homología de secuencias se incluyen en el apéndice 2.

```

>lcl|24225
Length=480

Score = 403 bits (446), Expect = 5e-117
Identities = 272/305 (89%), Gaps = 0/305 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 26  GATTACATAAGCCTTTTGGCTAAGGTTGGTTCAGTTGTGGAACGTTTGC GCGATCCCAGC 85
          |||
Sbjct 1   GATTACATAAGCCTTTTGGCTAAGGTCAGCGCTGTTGTGGAACGTTTATGCGATCCCAGC 60

Query 86  GTAACCTCAGGGAAGTGATGGACGAAATTAATGATTTTAACTCGTTTCTCGCTTTGGTG 145
          |||
Sbjct 61  GTAACCTTGC GGAAGTGATGGACGAAATTAATGACTTTAACTCGTTTCTCGCTTTAGTG 120

Query 146 CACTCTATGAAGTCGGACATGAACGGCGATCATCAGGAAGGTCACCATGAGATGGGTGAA 205
          |||
Sbjct 121 CACTCTATGAAGTCAGACATGAACGGAGACCATCAGGATGGCCACCACGAGATGGGTGAA 180

Query 206 CATAAACTCGGTTGTTGIGCAATATAGAGGCGAAACIGCGAGTCTTCTCGACATCATA 265
          |||
Sbjct 181 CACAAGTCTCGGTTGTTATGCAACATAGAGGCGAAATTGCGAGTACTTCTCGACATCATA 240

Query 266 AGACGTCGGTTTACTCGCGAAAACTGCTCTGTACCAGTGTACWGATGTTGTGGGCTTC 325
          |||
Sbjct 241 AGACGTCGGTTTACTCGCGACAAGCTGCTCTGTACTAGCGCGACAGATGTCATGGGCTTC 300

Query 326  TTCGT 330
          |||
Sbjct 301  TTIGT 305

```

Figura 18: Reporte de resultados obtenidos de la secuenciación del gen p20 de CTV del aislamiento Mx14 comparados con el aislamiento de referencia T36.

DISCUSION

Escherichia coli es uno de los hospedantes mayormente empleados para la producción de proteínas heterólogas de diversos orígenes (Baneyx, 1999). Desde principios la década de 1990, en que se empezó a conocer del genoma del CTV [8], *E. coli* ha sido el vehículo de elección para estudios de expresión de la mayoría de los genes que componen en genoma del CTV [14,33-37]. Asimismo, *E. coli* se ha empleado para la expresión masiva de la proteína recombinante de la cápside mayor del CTV para la producción de anticuerpos con fines de diagnóstico [38-41].

En el presente estudio, se empleó *E. coli* cepas JM109 y HB101 para clonar y expresar el gen p20 del aislamiento MX14 del CTV de México. El diseño de los iniciadores empleados para la amplificación de cDNA del gen de la proteína p20 resultó ser efectivo para este propósito. A diferencia de los iniciadores empleados con objetivos de diagnóstico como los diseñados por Cevik y cols., los iniciadores empleados en este trabajo incluyen la secuencia completa del gen que codifica para la proteína p20 de CTV, es decir, desde el codón de inicio (ATG), hasta la señal de terminación (TAG). Puesto que la reacción de retro-transcripción se llevó a cabo empleando RNA total, no se detectaron amplificaciones debidas a acoplamiento inespecíficos. Uno de los aspectos más destacados de este primer paso en la clonación del gen p20 fue el hecho de haber obtenido fragmentos amplificados de manera muy uniforme en todas las muestras de aislamientos que

confirmaron la presencia de bandas, observándose una sola banda clara y bien definida.

Si bien el amplicón obtenido en la retro-transcripción pudiera haber sido empleado en el proceso de clonación, los resultados tanto de este procedimiento como de la transformación no fueron del todo exitosos, por lo que se procedió a amplificar por PCR, empleando enzima de alta fidelidad obteniéndose finalmente mayor cantidad de inserto suficiente para ensayar diferentes proporciones plásmido-inserto para la reacción de ligación.

Las clonas transformantes de *E. coli* obtenidas, tanto para la cepa HB101 como para la JM109, presentaron un aspecto de colonia liso, color blanco y en general de apariencia uniforme. Una vez ordenadas en nuevas placas del medio selectivo, se procedió a la comprobación de la presencia del inserto p20. Ya que la inserción del cDNA en el vector plasmídico ocurre interrumpiendo la expresión del α -péptido de la β -galactosidasa, las colonias transformantes obtenidas no transforman el sustrato (X-gal), por lo tanto no se tiñen de azul. Debido al gran número de clonas seleccionadas, la realización de un cribado previo fue de gran utilidad para la selección de las cepas para confirmación por PCR, y para finalmente elegir las clonas destinadas al ensayo de producción de la proteína. De esta manera se lograron obtener un número aceptable de transformantes para la producción de la proteína p20 recombinante.

La detección de la proteína recombinante p20 expresada en las diversas clonas evaluadas (Figuras 11 y 12), así como de las proteínas no estructurales en tejido infectado visualizadas mediante Western blot, demuestra que la proteína expresada en *E. coli* presenta determinantes antigénicos con similitud a las proteínas presentes en plantas infectadas, ya que los anticuerpos reconocieron exclusivamente a esas proteínas del resto de las proteínas presentes en ambas muestras (Figuras 11 y 12).

El tejido empleado en el presente estudio, previamente fue determinado como positivo de estar infectado por el CTV mediante un ELISA-DASI con anticuerpos anti-p25, para el reconocimiento de la partícula viral (Tabla 7). Al estar presente el virus en la planta, se acumulan proteínas no estructurales a manera de cuerpos de inclusión, donde se ha consignado a la p20 como el principal componente de las inclusiones virales del CTV [14]. De manera que al evaluar el tejido infectado positivo al CTV, los anticuerpos obtenidos para la p20 recombinante, fueron efectivos para reconocer la p20 codificada por el genoma viral *in planta* (Figura 18).

La obtención de anticuerpos usando proteínas recombinantes, así como la evaluación de su efectividad ha sido ampliamente documentada para una serie de virus fitopatógenos, evaluando su eficiencia ya sea mediante Western blot y/o ELISA. Aunque, tales estudios se han llevado a cabo principalmente para la proteína estructural de la cápside (Vaira *et al.*, 1996; Raikhy *et al.*, 2007; Nickel *et*

al, 2004; Iracheta Cardenas *et al.*, 2008; Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009), existen relativamente pocos reportes para proteínas no estructurales. No obstante lo anterior, estos últimos también han resultado efectivos en la detección de plantas infectadas, como es el caso del *Grape vine virus A* (Rubinson *et al.*, 1997), del *Potato mop-top virus* (Cеровска *et al.*, 2006) y *Potato virus A* (Nováková *et al.*, 2006).

Los anticuerpos anti-p20 empleados en el presente estudio se obtuvieron utilizando como inmunógeno la proteína p20 de la clona 3 HB-101, purificada mediante geles de poliacrilamida (López-Alvarado, 2009).

El porcentaje de homología entre las secuencias de p20 comparadas, de T36 y MX14, reveló diferencias (89%) que si bien no pueden considerarse definitivas para determinar diferencias entre ambos aislamientos, por tratarse de la secuencia nucleotídica de un solo gen, contribuye de manera importante al conocimiento a nivel molecular de los aislamientos de CTV de árboles de la región. Si bien, las tasas de mutación en virus de RNA son altas, el establecimiento de diferencias entre los distintos aislamientos ejerce un alto impacto en la clasificación y designación de cepas severas o leves de CTV (Cevik, 1996; Huang, *et al.*, 2004; Herron, 2005; Agrios, 2005).

La expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es relativamente simple, rápida y de bajo costo, lo que permite producir grandes cantidades de proteínas

puras que pueden ser usadas como inmunógeno en la producción de anticuerpos con fines de diagnóstico; todo esto, sin los inconvenientes de purificación por los métodos convencionales a partir de plantas infectadas, como son la propagación de virus en plantas a nivel de invernadero, el mantenimiento de las plantas infectadas y el bajo rendimiento en la purificación de viriones, particularmente de virus filamentosos.

CONCLUSIONES

1. El método de extracción de RNA total de las muestras por CTV proporcionó suficiente RNA viral para generar el DNA complementario correspondiente por retrotranscripción.
2. Se obtuvo el DNA complementario mediante retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la proteína p20 de CTV a partir del RNA obtenido.
3. El DNA complementario del gen de la proteína p20 de CTV para la muestra MX14 fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa con una estandarización en la T_m de los iniciadores de 62°C.
4. La proteína p20 de CTV se logró producir de manera recombinante en cepas HB101 y JM109 de *E. coli*.
5. La secuencia nucleotídica del gen p20 de CTV de la muestra MX14 presenta un 89% de homología con respecto del aislamiento tipo T36.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda clonar la proteína p20 de los aislamientos 4038 L-8 A3, 4028 L-1 A11, 4038 L5 A-4, 166 L38 A8, 166 L23 A10, T166 L23 A10, T166 L26-1 A11, T 55, T 66, Anacuitas, A 27 (2), A 10 (3), A 11 Nte.
2. Se recomienda optimizar los parámetros para la sobreexpresión de la proteína recombinante p20.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bar-Joseph, M., and Lee, R.F. 1989. Citrus tristeza virus. Descriptions of Plant Viruses No. 353 (No. 33 revised), Kew, Surrey, UK, Commonwealth Mycological Institute, 7 pp.
2. Rocha-Peña, M.A. 2009. El virus tristeza de los cítricos en México: Hechos y Perspectivas. *Revista Conocimiento* 96:70-73.
3. Yokomi, R.K., Lastra, R., Stoetzel, M.B., Damgsteet, V.D., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Gottwald, T.R., Rocha-Peña, M.A., and Niblett, C.L. 1994. Establishment of the brown citrus aphid *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera:Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and its transmission of citrus tristeza virus. *Journal Economic Entomology* 87:1078-1085.
4. Rocha-Peña, M.A., Lee, R.F., Lastra R., Niblett, C.L., Ochoa-Corona, F.M., Garnsey, S.M., and Yokomi, R.Y. 1995. Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in Caribbean and Central and North América. *Plant Dis.* 79:437–445.
5. Rocha-Peña, M.A., Ochoa-Corona, F.M., Martínez-Soriano, J.P., Roistacher, C.N., and Lee, R.F. 1998. Citrus tristeza virus: Events that occur before, during and after the disease epidemics. *Subtropical Plant Science* 50:26-36.
6. CABI y EPPO. Citrus tristeza closterovirus. Data sheets on quarantine pests. http://www.eppo.org/QUARANTINE/virus/Citrus_tristeza/CTV000_ds.pdf
7. Garnsey, S.M., Civerolo, E.L., Gumpf, D.J., Paul, C., Hilf, M.E., Lee, R.F., Brlansky, R.H., Yokomi, R.K., and Hartung, J.S. 2005. Biological characterization of an international collection of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates. pp 75-93, in: Proc. 16th Conf. Int. Org. Citrus Virologists. Hilf, M.E., Durán-Vila, N., and Rocha-Peña, M.A. (eds). Riverside, California.
8. Febres, V.J., Ashoulin, L., Mawassi, M., Frank, A., Bar-Joseph, M., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1996. The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331–1335.
9. Pappu, H.R., Karasev, A.V., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Hilf, M.E., Febres, V.J., Eckloff, R.M.G., McCaffery, M., Boyko, V., Gowda, S., Dolja, V.V., Koonin, E.V., Gumpf, D.J., Cline, K.C., Garnsey, S.M., Dawson, W.O., Lee, R.F., Niblett, C.L. 1994. Nucleotide sequence and organization of eight 3' open reading frames of the citrus tristeza closterovirus genome. *Virology* 199:35–46.
10. Karasev, A.V., Boyko, V.P., Gowda, S., Nikolaeva, O.V., Hilf, M.E., Koonin, E.V., Niblett, C.L., Cline, K., Gumpf, D.J., Lee, R.F., Garnsey, S.M., Lewandowski, D.J.,

- and Dawson, W.O. 1995. Complete sequence of the citrus tristeza virus RNA genome. *Virology* 208, 511-520.
11. Ruiz-Ruiz, S., Moreno, P., Guerri, J., and Ambrós, S. 2006. The complete nucleotide sequence of a severe stem pitting isolate of *Citrus tristeza virus* from Spain: comparison with isolates from different origins. *Archives of Virology* 151: 387–398.
 12. Albiachi-Marti, M.R., Mawassi, M., Gowda, S., Satarayana, T., Hilf, M.E., Shanker, S., Almira, E.C., Vives, M.C., López, C., Guerri, J., Flores, R., Moreno, P., Garnsey, S.M., and Dawson, W.O. 2000. Sequences of *Citrus tristeza virus* separated in time and space are essentially identical. *Journal of Virology* 74: 6856-6865.
 13. Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W-X., Falk, B.W., Dawson, W.O., Ding, S-W., 2004. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:15742–15747.
 14. Gowda, S., Satyanarayana, T., Davis, C.L. Navas-Castillo, J., Albiach-Mart, MR., Mawassi, M., Valkov, N., Bar-Joseph, M., Moreno, M., Dawson, W.O. 2000. The p20 gene product of *Citrus tristeza virus* accumulates in the amorphous inclusion bodies. *Virology* 274:246-254.
 15. Garnsey, S. M., Christie, R. G., Derrick, K. S., and Bar-Joseph, M. 1980. Detection of citrus tristeza virus. II. Light and electron microscopy of inclusions and viral particles. pp. 9-16, in: *Proc. 8th Conf. Int. Org. Citrus Virologists*. Calavan, E.C., Garnsey, S.M., and Timmer, L.M. (eds). Riverside. California.
 16. Rocha-Peña, M.A. and Lee, R.F. 1991. Serological techniques for detection of citrus tristeza virus. *Journal of Virological Methods* 34:311-331.
 17. Iracheta-Cárdenas, M.M., Peña del Río, M.A. Rocha-Peña, M.A. 2005. Comparación de antisueros comerciales para la detección del virus tristeza de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:323-328.
 18. Niblett, C.L., Genc, H., Cevik, B., Halbert, S., Brown, L., Nolasco, G., Bonacalza, G., Manjunath, K.L., Febres, V.J., Pappu, H.R., and Lee, R.F. 2000. Progress on strain differentiation of *Citrus tristeza virus* and its application to the epidemiology of the citrus tristeza disease. *Virus Research* 71:91-106.
 19. Hung, T.H., M.L. Wu, and H.J. Su. 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of *Citrus tristeza virus*. *Journal of Phytopathology* 148:469-475.
 20. Cevik, B., Pappu, S.S., Pappu, H.R., Benschler, D., Irely, M., Lee, R.F., and Niblett C.L. 1996. Application of bi-directional PCR to citrus tristeza virus: detection and strain differentiation. pp 17-24, in: *Proc. 13th Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists*. da Graça, J.V., Moreno, P., and Timmer, L.W. (eds).Riverside, California.

21. Iracheta-Cárdenas, M.M., Almeyda-León, I.H., Manjunath, K.L. Cevik, B., Niblett, C., Lee, R., and Rocha-Peña, M.A. 2002. Molecular cloning and expression of the p25 gene of two Mexican isolates of *Citrus tristeza virus*. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20:174–181.
22. Iracheta-Cárdenas, M.M., Metheney, P., Polek, ML, Manjunath, K.L. Lee, R.F., Rocha-Peña, M.A. 2009. Serological detection of *Citrus tristeza virus* with antibodies developed to the recombinant coat protein. *Plant Disease* 93:11-16.
23. Permar, T.A., S.M. Garnsey, D.J. Gumpf, and R.F. Lee. 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of citrus tristeza virus. *Phytopathology* 80:224-228.
24. Rocha-Peña, M.A., R.F. Lee, and R.K. Yokomi. 1995. Biological properties and aphid transmission of selected citrus tristeza virus isolates from Florida. *Rev. Mex. Fitopatol.* 13:88-94.
25. Silva-Vara, S., Peña del Río, M.A., Peña-Martínez, R., Villegas-Jiménez, N., Byerly-Murphy, K.F., y Rocha-Peña, M.A. 2001. Distribución del virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo León, México. *Agrociencia* 35:441-450.
26. González-Garza, R. 1983. Identificación y control de las virosis de los cítricos en los estados de Nuevo León y Tamaulipas. Informe de Labores. CAEGET/INIA/SARH. Convenio Cooperativo de Investigación en Virología Vegetal INIFAP-UANL. Monterrey, Nuevo León, México (Mimeo). 175 p.
27. Promega Corporation. 2009. SV Total RNA isolation System Technical Manual. Part# TM048. <http://www.promega.com.cn/techserv/tbs/TM001-310/tm048.pdf>
28. Promega Corporation. 2001. AccessQuick™ RT-PCR System: Simple, Stable and Sensitive. http://www.promega.com/pnotes/79/9492_12/9492_12.pdf
29. Promega Corporation. 2009. pGEM-T and pGEM-T Easy vector systems. Promega. Technical Manual. Part# TM042. www.promega.com/tbs/tm042/tm042.pdf
30. Promega Corporation. 2001. Protocols and Applications Guide: Nucleic acid amplification. Taq DAN polymerase. <http://www.promega.com/paguide/chap1.htm>
31. Sambrook, J., and Russel, D.W. 2001. *Molecular cloning: A laboratory Manual*. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor New York.
32. Baneyx, F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinions in Biotechnology* 10:411–421.
33. Febres, V.J., Pappu, H.R., Anderson, E.J., Pappu, S.S., Lee, R.F., and Niblett, C.L. 1994. The diverged copy of the citrus tristeza virus coat protein is expressed in vivo. *Virology* 178:178-181.

34. Manjunath, K.L., Pappu, H.R., Lee, R.F., Niblett, C.L., and Civerolo, E.L. 1993. Studies on the coat protein genes of four isolates of citrus tristeza closterovirus from India: Cloning, sequencing and expression. pp. 20-27, in: Proc. 12th Conf. Intern. Organ. Citrus Virologists. Moreno, P., da Graça, J.V., and Timmer, L.W. (eds). Riverside, California.
35. Cevik, B. 2001. Characterization of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Citrus tristeza closterovirus. PhD Thesis. University of Florida, Gainesville, FL, 138 p.
36. Rosales-Villavicencio, I.M. 2001. Characterization of the hsp70 protein homolog (hsp70h) of citrus tristeza closterovirus. PhD Thesis. University of Florida, Gainesville, FL. 116p
37. López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., and Flores, R. 2000. The 23 kDa protein coded by the 3'-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* 269:462–470.
38. Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Gumpf, D.J., Lee, R.F., and Garnsey, S.M. 1995. Production of polyclonal antisera to the coat protein of citrus tristeza virus expressed in *Escherichia coli*: Application for immunodiagnosis. *Phytopathology* 85:691-694.
39. Tragon, M.L.P.N., Nikolaeva, O., Manjunath, K.L., Lee, R.F., Muller, G.W., and Machado, M.A. 1997. Coat protein gene of a Brazilian isolate of the citrus tristeza virus: cloning, expression in *E. coli* and production of polyclonal antiserum. *Fitopatologia Brasileira* 22:99–102.
40. Sequeira, Z., and Nolasco, G. 2002. Bacterial expressed coat protein: development of a single antiserum for routine detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathologia Mediterranea* 41:55–62
41. Iracheta-Cárdenas, M.M., Sandoval-Alejos, B.D., Román-Calderón, M.E., Manjunath, K.L. Lee, R.F., and Rocha-Peña, M.A. 2008. Production of polyclonal antibodies to the recombinant coat protein of *Citrus tristeza virus* and their effectiveness for virus detection. *Journal of Phytopathology* 156:243-250. ISSN: 0931-1785.
42. Huang, Z., Rundell, P. A., Guang, Xiong and Powell, C.A. 2004. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease* 88:625:629.
43. Herron, C.M., Mirkov, T.E., Solís-García, Kahlke, C.J. Skaria, M. and da Garca, J.V. 2005. Severity of *Citrus tristeza virus* isolates from Texas. *Plant Disease* 89:575:580.
44. Agrios, George. *Plant Pathology*. 5th Edition. 2005. Academic Press. USA.

45. Vaira, A.M., Vecchiati, M., Masenga, V., and Accotto, G.P. 1996. A polyclonal antiserum against a recombinant viral protein combines specificity with versatility. *Journal of Virological Methods* 56:209–219.
46. Nickel, O., Targon, M.L.P.N., Fajardo, T.V.M., Machado, M.A., Trivilin, A.P., 2004. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Apple stem grooving virus* expressed in *Escherichia coli*: production and use in immunodiagnosis. *Fitopatologia Brasileira* 29:558–562.
47. Raikhy, G., Hallan, V., Kulshrestha, S., Zaidi, A.A. 2007. Polyclonal antibodies to the coat protein of *Carnation etched ring virus* expressed in bacterial system: production and use in immunodiagnosis. *Journal of Phytopathology* 155:616–622.
48. Gulati-Sakhuja, A., Sears, J.L., Alberto Nunez, A., and Liu, H-Y. 2009. Production of polyclonal antibodies against *Pelargonium zonate spot virus* coat protein expressed in *Escherichia coli* and application for immunodiagnosis. *Journal of Virological Methods* 160:29–37.
49. Rubinson, E., Galiakparov, N., Radian, S., Sela, I., Tanne, E., Gafny, R., 1997. Serological detection of Grapevine virus A using antiserum to a nonstructural protein, the putative movement protein. *Phytopathology* 87, 1041–1045.
50. Cerovská, N., Filigarová, M., and Pecenková, T. 2006. Production of polyclonal antibodies to a recombinant *Potato mop-top Virus* non-structural triple gene block protein. *Journal of Phytopathology* 154:422–427.
51. Nováková, S., Kludiny, J., Kollerová, E., and Subr, Z.W., 2006. Expression of a part of the *Potato virus A* non-structural protein P3 in *Escherichia coli* for the purpose of antibody preparation and P3 immunodetection in plant material. *Journal of Virological Methods* 137:229–235.
52. López Alvarado, C.B. 2009. Obtención y evaluación de anticuerpos específicos contra para proteína no estructural p20 del virus tristeza de los cítricos. Tesis Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.

APÉNDICE I

Preparación de medios de cultivo, soluciones y buffers

	Reactivo	Cantidad (1 L)
Medio LB	Triptona	10g
	Extracto de levadura	5g
	Cloruro de Sodio	10g
	Agar	15g
	Agua bidestilada	Se afora a 1L

Ajustar a pH 7 con Hidróxido de Sodio

Medio LB/amp	Triptona	10g
	Extracto de levadura	5g
	Cloruro de Sodio	10g
	Agar	15g
	Ampicilina 50µg/mL	1250µL
	Agua bidestilada	Se afora a 1L
	pH 7	

Ajustar a pH 7 con Hidróxido de Sodio

Medio Magic Media/amp	Componente A	39mg
	Agua bidestilada	950 mL
	Componente B	50mL
	Ampicilina	1250µL

Todos los medios de cultivo se esterilizan a 15psi durante 20 minutos

Ampicilina 50µg/mL	Ampicilina	500µL
	Agua estéril	10mL

Gel agarosa 1%	TAE 1x	60 mL
	Agarosa	0.6 g

Etanol 70%	Etanol absoluto (96%)	700mL
	Agua bidestilada	300mL

Cloruro de Calcio 10mM	CaCl ₂	1.10g
	Agua estéril	Se afora a 1L

Se esteriliza con filtro whatman 0.2 µL

Solución I (lisis alcalina)	50mM Tris	6.057g
------------------------------------	-----------	--------

	10mM EDTA	20mL
	20mM glucosa	
	Agua bidestilada	Se afora a 1L
Ajustar a pH 8		
Solución II (lisis alcalina)	SDS 1%	100mL
	NaOH 5M	40mL
	Agua bidestilada	860mL
Solución III (lisis alcalina) Acetato de amonio 10M	Acetato de amonio	77.08g
	Agua bidestilada	Se afora a 1L
Solución separadora SDS-PAGE 15% Volumen final 10mL	Agua bidestilada	2.3mL
	Solución acrilamida 30%	5.0mL
	Tris 1.5M pH 8.8	2.5mL
	10% SDS	0.1mL
	10% persulfato de amonio	0.1mL
	TEMED	5µL
Solución concentrada 5% Volumen final 5mL	Agua bidestilada	3.4mL
	Solución acrilamida 30%	0.83mL
	Tris 1.0M pH 6.8	0.63mL
	10% SDS	0.05mL
	10% persulfato de amonio	0.05mL
	TEMED	5µL
Solución acrilamida 30%	Acrilamida	290g
	Bis-acrilamida	10g
	Agua bidestilada	1L
Persulfato de amonio 10% Volumen final 1mL	Persulfato de amonio	0.1g
	Agua bidestilada	1mL
SDS 10%	SDS	100g
	Agua bidestilada	1L
TAE 50x	2.0 M Tris	242.28 g
	Ácido acético glacial	57.10 mL
	50 mM EDTA pH 8	100 mL

	Agua bidestilada	Se afora a 1L
Buffer de lisis	Tris 1M pH 6.8	250mL
	SDS 10%	400mL
	Glicerol	200mL
	β -mercaptoetanol	100mL
	Agua	50mL
Buffer de transferencia	Tris base 48mM	5.8g
	Glicina 39 mM	2.92g
	Metanol 20%	200mL
	SDS 10%	3.75mL
	Agua bidestilada	Se afora a 1L

APÉNDICE 2

Resultados del análisis del porcentaje de homología por comparación de secuencias nucleotídicas del gen p20 de CTV del aislamiento Mx14 con el aislamiento de referencia T36.

Query: p20 t36
Sbjct: p20 Mx14

Legend for links to other resources: [U](#) UniGene [E](#) GEO [G](#) Gene [S](#) Structure [M](#) Map Viewer

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
24225		403	403	92%	5e-117	89%	

