

ESTRUCTURA POBLACIONAL DE AISLAMIENTOS DEL CITRUS TRISTEZA VIRUS Y SU ASOCIACIÓN CON LA MUERTE SÚBITA DE LOS CÍTRICOS EN BRASIL

POPULATION STRUCTURE OF CITRUS TRISTEZA VIRUS ISOLATES AND ITS ASSOCIATION WITH CITRUS SUDDEN DEATH IN BRAZIL

Patricia Rivas-Valencia¹, Emiliano Loeza-Kuk¹, Gustavo Mora-Aguilera¹, Vicente Febres², Daniel Ochoa-Martínez¹, Ma. Alejandra Gutiérrez-Espinosa³, Waldir Cintra de Jesus-Junior⁴, Celia Correia-Malvas⁵ y Nelson Arno-Wulff⁵

¹Fitopatología y ³Fruticultura. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (morag@colpos.mx). ²University of Florida, Gainesville, FL, USA. ⁴UFES, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brasil. ⁵FUNDECITRUS A.C. CEP 14807-040, Araracuara, SP, Brasil.

RESUMEN

Se desconoce la etiología de la enfermedad muerte súbita de los cítricos (MSC) y su relación con una variante severa del virus tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza virus*, CTV). Para estudiar una posible relación se estudiaron cinco poblaciones de 100 árboles cada una, en regiones con y sin presencia MSC, en huertas comerciales de los estados de São Paulo y Minas Gerais, Brasil. En las huertas con MSC se observó decoloración foliar, defoliación, crecimiento vegetativo reducido y eventualmente muerte del árbol. El objetivo de este estudio fue caracterizar la estructura poblacional de aislamientos de CTV presentes en ambas regiones con el fin de asociar etiológicamente al CTV con la MSC. Únicamente 96/500 muestras amplificaron para el gen de la capa proteica (CP) del CTV, las que fueron sometidas a hibridación con sondas específicas y a un análisis de conformación polimórfica de cadena simple de ADN (single-strand conformation polymorphism, SSCP). Los porcentajes de hibridación con sondas específicas para aislamientos severos de CTV fueron 79.60% y 84.67% en la región con y sin MSC, por lo que no se encontró una asociación definitiva de aislamientos severos con MSC. El análisis SSCP determinó la presencia de hasta cinco haplotipos en un solo árbol en regiones con MSC, y hasta siete en regiones sin MSC. No se encontró un patrón dominante. El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró una mayor variación dentro de poblaciones que entre regiones, lo que indica una estructura poblacional heterogénea con origen local. Con los datos obtenidos no se determinó una relación directa entre aislamientos severos de CTV y la MSC, pero tampoco se descartó la posible función del CTV en el nuevo síndrome.

Palabras clave: Hibridación, sondas específicas, SSCP.

INTRODUCCIÓN

La tristeza de los cítricos, ocasionada por el Citrus tristeza virus (CTV), es producto de una población constituida por distintos aislamientos

Recibido: Julio, 2006. Aprobado: Noviembre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 85-93, 2008.

ABSTRACT

The etiology of citrus sudden death (CSD) and its relationship with a severe variant of the citrus tristeza virus (*Citrus tristeza virus*, CTV) is unknown. To discover a possible relationship, a study was made of five populations of 100 trees each one, in regions with and without CSD presence, in commercial groves of the states of São Paulo and Minas Gerais, Brazil. In the groves with CSD, foliar discoloration was observed, along with defoliation, reduced vegetative growth and eventually tree death. The objective of the present study was to characterize the population structure of CTV isolates present in both regions with the purpose of etiologically associating CTV with CSD. Only 96/500 amplified for the gene of the coat protein (CP) of the CTV, which were subjected to hybridation with specific probes and to an analysis of single-strand conformation polymorphism (SSCP). The percentages of hybridation with specific probes for severe CTV isolations were 79.60% and 84.67% in the region with and without CSD. Therefore, no definite association was found of severe isolations with CSD. The SSCP analysis determined the presence of up to five haplotypes in a single tree in regions with MSC, and as many as seven in regions without CSD. A dominant pattern was not found. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed a greater variation within populations than among regions, which indicates a heterogeneous population structure with local origin. With the data obtained, no direct relationship was determined between severe CTV isolates and CSD, but the possible involvement of CTV in the new syndrome was not discarded.

Key words: Hybridation, specific probes, SSCP.

INTRODUCTION

Citrus tristeza, caused by the Citrus tristeza virus (CTV), is the product of a population comprised of different isolates that are biologically dynamic (Weng *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2004). The virus, detected in Brazil in 1934, has caused the death of over 100 million trees in South America, The United

biológicamente dinámicos (Weng *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2004). El virus, detectado en Brasil en 1934, ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles en América del Sur, Estados Unidos de Norteamérica, Israel y España (Müller *et al.*, 2000; Cambra *et al.*, 2000). El CTV puede encontrarse en todas las especies y variedades de cítricos en Brasil por su carácter endémico y por los programas intensivos de protección cruzada (Souza *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2000). En 1999 se reportó un síndrome denominado muerte súbita de los cítricos (MSC) en 500 árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) injertados en limón cravo (*C. limonia*), una de las combinaciones más exitosas para el control genético del CTV (Bassanezi *et al.*, 2003). Actualmente la MSC ha afectado a más de 2 millones de árboles. Los síntomas y el progreso epidemiológico de la MSC son análogos al declinamiento de los cítricos, causado por aislamientos severos del CTV (Jesus-Junior y Bassanezi, 2004; Bassanezi *et al.*, 2003). La hipótesis propuesta es que el agente causal de la MSC es una variante nueva del CTV (Bassanezi *et al.*, 2003).

En México no existe la MSC ni aislamientos severos del CTV con alta prevalencia; sin embargo, el riesgo de epidemias de alta intensidad ante la introducción de *Toxoptera citricida*, el vector más eficiente de variantes severas del CTV, obliga a estudiar los mecanismos intrínsecos del patógeno para adaptarse e inducir nuevas epidemias y mitigarlas mediante los principios de exclusión y erradicación. Con este fin se realizó el presente trabajo en las condiciones de Brasil, con el objetivo de efectuar un estudio comparativo a nivel molecular de la estructura poblacional del CTV, en regiones con aislamientos de tipo severo, y con presencia y ausencia de MSC para contribuir al entendimiento etiológico y epidémico de la MSC.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del área de estudio

El estudio se hizo de septiembre a noviembre de 2005. Se realizaron muestreos con ayuda de personal de campo de FUNDECITRUS A.C.⁶ en cinco huertas comerciales ubicadas en los estados de São Paulo (SP) y Minas Gerais (MG). En la región de SP los árboles mostraban síntomas de tristeza (picado de tallo) y presencia de aislamientos severos y moderados de CTV. Éstos se detectaron previamente por FUNDECITRUS A.C. En las huertas de MG se observó la presencia de MSC (Cuadro 1).

El muestreo se enfocó a árboles con síntomas de declinamiento, según la escala de severidad propuesta por Bassanezzi *et al.* (2003). De los 500 árboles se recolectaron hojas jóvenes (última brotación)

States, Israel and Spain (Müller *et al.*, 2000; Cambra *et al.*, 2000). CTV can be found in all of the citrus species and varieties in Brazil due to its endemic character and the intensive program of cross protection (Souza *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2000). In 1999, a syndrome named citrus sudden death (CSD) was reported in 500 sweet orange trees (*Citrus sinensis*) grafted in Rangpur lime (*C. limonia*), one of the most successful combination for the genetic control of CTV (Bassanezi *et al.*, 2003). Presently, CSD has affected more than 2 million trees. The symptoms and epidemiological progress of CSD are analogous to citrus decline, caused by severe isolates of CTV (Jesus-Junior and Bassanezi, 2004; Bassanezi *et al.*, 2003). The proposed hypothesis is that the causal agent of CSD is a new variant of CSD (Bassanezi *et al.*, 2003).

In México there is no CSD, nor severe isolates of CTV with high prevalence. However, the risk of high intensity epidemics with the introduction of *Toxoptera citricida*, the most efficient vector of severe variants of CTV, demands the study of the intrinsic mechanisms of the pathogen to adapt and induce new epidemics, and mitigate them through the principles of exclusion and eradication. The present study was carried out for this purpose under the conditions of Brazil, with the objective of making a comparative study at the molecular level of the population structure of CTV, in regions with severe isolates, and with the presence and absence of CSD, to contribute to the etiological and epidemiological understanding of CSD.

MATERIALS AND METHODS

Location of the area of study

The study was made from September to November of 2005. Samplings were made with the assistance of field personnel of FUNDECITRUS A.C.⁶ in five commercial groves located in the states of São Paulo (SP) and Minas Gerais (MG). In the region of SP, the trees presented symptoms of tristeza (stem damage) and presence of severe and moderate isolates of CTV. These infections had been previously detected by FUNDECITRUS A.C. In the groves of MG, it was observed the presence of CSD (Table 1).

The sampling was focused on trees with decline symptoms, according to the severity scale proposed by Bassanezzi *et al.* (2003). Of the 500 trees, young leaves were collected (most recent budding) in the four cardinal points at an average height of 1.50 m, for molecular processing in the installations of FUNDECITRUS A.C.

⁶ Fundo de Defesa da Citricultura, A.C. Av. Adhemar Pereira de Barros, 201 CEP 14807-40 Aracajuara, São Paulo, Brasil.

Cuadro 1. Características agronómicas de huertos muestreados con respecto al CTV y MSC en las localidades cítricas de São Paulo (SP) y Minas Gerais (MG), Brasil.**Table 1. Agronomic characteristics of sampled groves with respect to CSD and MSC in the citrus growing localities of Sao Paulo (SP) and Minas Gerais (MG), Brazil.**

Localidad y Estado	Nombre del huerto	Sanidad [†]	Injerto/portainjerto	Manejo [¶]
Capela do Alto, SP	CA	- MSC/Picadura tallo [§]	Pera/Cravo	++
Capão Bonito, SP	CB	- MSC / CTV severo	Pera/Cravo	++
Botucatu, SP	BT	- MSC / CTV moderado	Pera/CravoPera/Cravo	++
Comendador Gomes MG	NM	+ MSC / CTV Moderado	Hamlin/cravo	+++
Uberlândia, MG	SV	+ MSC / CTV Moderado	Pera/Cravo	+++

[†] MSC=muerte súbita de los cítricos; CTV=Citrus tristeza virus.

[¶] Manejo: ++ tecnificado, +++ Altamente tecnificado.

[§] picado del tallo = síntoma severo de tristeza.

en los cuatro puntos cardinales a una altura promedio de 1.50 m, para su procesamiento molecular en las instalaciones de FUNDECITRUS A.C.

Extracción de RNA y RT-PCR de un paso para la amplificación parcial y total de la capa proteica (CP)

Se usó Trizol[®] Reagent (Invitrogen[™]) para la extracción de RNA total de cada muestra (100 mg de hoja fresca), según protocolo del fabricante (Cat. No. 15596-018). La amplificación de la CP total por RT-PCR de un paso se realizó con 5 μ L de RNA total precalentado 5 min a 65 °C, mezclado en un volumen final de 50 μ L usando 10 \times PCR buffer, 2.5 mM de MgCl₂, 0.1 mM de DDT, 200 μ M de dNTP's, 0.5 μ L (100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹) de los iniciadores HCP1 5' ATGGACGACGAAACAAACAA3' y HCP2 5' TCAACGTGTGTTGAATTTCC 3' (Huang *et al.*, 2004), 20 unidades de RNaseout (Invitrogen[™]), 50 unidades de M-MLV transcriptase reversa (Invitrogen[™]) y 1.25 unidades de Taq DNA Polymerase (Promega[™]). La RT-PCR se hizo con un ciclo de 60 min a 42 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C y un periodo de extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de la amplificación (672 pb) se analizó en gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio. También se amplificó una parte del gen p25 que codifica a la CP en el extremo 3' (273 pb) con 0.5 μ L (100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹) de los iniciadores específicos CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGG TAGGA3' y CPKR 5'TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000). El producto de la amplificación se analizó en gel de agarosa a 1% teñido con bromuro de etidio.

Análisis SSCP

El SSCP (single-strand conformation polymorphism) detecta mutaciones y cambios puntuales de bases en fragmentos de ADN del mismo tamaño (polimorfismo) (Kong *et al.*, 2000). La identificación de los patrones de SSCP se realizó a partir del producto de PCR de parte del gen p25 de la CP (273 pb). Se tomaron 5 μ L del producto de amplificación y se desnaturizó por 10 min a 99 °C en un volumen de solución desnaturizante (95% formamida, 20 mM EDTA, bromofenol azul y xilen-cianol). Los fragmentos se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en una cámara

Extraction of RNA and one-step RT-PCR for the partial and total amplification of the coat protein (CP)

Trizol[®] Reagent (Invitrogen[™]) was used for the extraction of total RNA of each sample (100 mg of fresh leaf), according to the protocol of the manufacturer (Cat. No. 15596-018). The amplification of the total CP by one-step RT-PCR was made with 5 μ L of total RNA preheated 5 min at 65 °C, mixed in a final volume of 50 μ L using 10 \times PCR buffer, 2.5 mM of MgCl₂, 0.1 mM of DDT, 200 μ M of dNTP's, 0.5 μ L (100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹) of the primers HCP1 5' ATGGACGACGAAACAAACAA3' and HCP2 5' TCAACGTGTGTTGAATTTCC 3' (Huang *et al.*, 2004), 20 units of RNaseout (Invitrogen[™]), 50 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen[™]), and 1.25 units of Taq DNA Polymerase (Promega[™]). The RT-PCR was made with a cycle of 60 min at 42 °C, 35 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C and a final extension period of 10 min at 72 °C. The product of the amplification (672 pb) was analyzed in agarose gel at 1% stained with etidium bromide. A part of gene p25 that codifies the CP in the 3' extreme (273 pb) was also amplified with 0.5 μ L (100 ng $\cdot\mu$ L⁻¹) of the specific primers CPKF 5' AACGCCCTTCGAGTCTGGGGTAGGA3' and CPKR 5'TCAACGTGTGTTGAATTTCCCAAGC 3' (Kong *et al.*, 2000). The product of the amplification was analyzed in agarose gel at 1% stained with etidium bromide.

SSCP Analysis

The SSCP (single-strand conformation polymorphism) detects mutations and punctual changes of bases in DNA fragments of the same size (polymorphism) (Kong *et al.*, 2000). The identification of the SSCP patterns was made from the product of PCR of part of the gene p25 of the CP (273 pb). Five μ L of the amplification product were taken, and was denaturalized for 10 min at 99 °C in a volume bromophenol and xylene-cyanol). The fragments were separated by means of electrophoresis in polyacrylamide at 12% in a BIORAD Protean II chamber (16 \times 20 cm \times 1mm) with TBE buffer 1 \times at 200 v for 2 h 30 min at room temperature (RT); the gel was stained with silver according to the protocol of Beidler *et al.* (1982).

BIORAD Protean II (16×20cm×1mm) con amortiguador TBE 1× a 200 v por 2 h 30 min a temperatura ambiente (TA); el gel fue teñido con plata según el protocolo de Beidler *et al.* (1982).

Síntesis y marcaje de sondas

Para evaluar la estructura poblacional y detectar la prevalencia de aislamientos que pudieran ser responsables de la etiología de la MSC, se sintetizaron seis oligonucleótidos que se utilizaron como sondas y que fueron diseñados a partir de diferencias de bases en la capa proteica de los aislamientos originarios de diferentes regiones geográficas (Cevick *et al.*, 1996) (Cuadro 2). El marcaje de las sondas se realizó con digoxigenina (DIG) con 'DIG DNA Labeling Kit', (Roche™), con el protocolo del fabricante. Estas sondas no habían sido utilizadas en Brasil para este tipo de estudio.

Dot blotting, hibridación y revelado

El producto obtenido de PCR con los iniciadores HCP1 y HCP2 se diluyó con 10X SSC para obtener un volumen final de 50 µL. Se colocó las muestras en una membrana de nylon (Hybond N+) con un aparato para dot blot (Gibco™). Se desnaturizó al DNA incubando la membrana en 0.4 M NaOH por 10 min a TA con agitación suave (AS). Posteriormente se incubó la membrana en 0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 0.1% SDS y 1X SSC a TA por 10 min. Después se fijó el DNA de la membrana con rayos ultravioleta. Se prepararon 4 membranas de 9×12 cm con 6 repeticiones y se almacenaron a 4 °C. La prehibridación de las membranas se realizó a 37 °C por una hora con AS en tubos de vidrio para hibridación (Hybaid™) en 20 ml de solución de prehibridación (5× SSC, 0.02% SDS, 1% reactivo bloqueante de Roche™). Se descartó la solución de prehibridación y se agregaron 20 ml de solución de hibridación precalentada con 9 pmol de sonda marcada. Las membranas se mantuvieron en esta solución toda la noche a 37 °C con AS en una estufa de hibridación Hybaid™. Al siguiente día, las membranas fueron lavadas con 6X SSC a TA por 5 min en AS y dos veces con 4X SSC conteniendo 0.1% SDS a 45 °C por 10 min (sondas 0, I, II, III, y VI) y a 55 °C por 10 min (sonda V). Adicionalmente se hicieron dos lavados con solución de maleato 1M pH 7.5 y 0.3% Tween por 15 min y uno con solución de maleato por 5 min. Para el revelado de las membranas se agregó una solución con el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche™) (dilución de 1/10000) y se incubaron por 30 min a TA, se lavaron dos veces por 15 min con

Synthesis and marking of probes

To evaluate the population structure and detect the prevalence of isolates that could be responsible for the etiology of CSD, six oligo nucleotides were synthesized, which were used as probes and were designed from differences of bases in the coat protein of the isolates from different geographic regions (Cevick *et al.*, 1996) (Table 2). The marking of the probes was made with digoxigenine (DIG) with 'DIG DNA Labeling Kit' (Roche™), with the protocol of the manufacturer. These probes had not been used in Brazil for this type of study.

Dot blotting, hybridation and development

The product obtained from PCR with the primers HCP1 and HCP2 was diluted with 10X SSC to obtain a final volume of 50 µL. The samples were placed in a nylon membrane (Hybond N+) with a dot blotting apparatus (Gibco™). The DNA was denaturalized by incubating the membrane in 0.4 M NaOH for 10 min to TA with slow agitation (SA). Then the membrane was incubated in 0.2 M Tris-Cl pH 8.0, 0.1% SDS and 1X SSC at RT for 10 min. Next, the DNA of the membrane was fixed with ultraviolet rays. Four membranes were prepared measuring 9×12 cm with six replicates and were stored at 4 °C. The pre-hydration of the membranes was carried out at 37 °C for one hour with SA in glass tubes for hydration (Hybaid™) in 20 ml of pre-hydration solution (5×SSC, 0.02% SDS, 1% Roche™ blocking reactant). The pre-hydration solution was discarded and 20 ml of hybridation solution were added preheated with 9 pmol of marked probe. The membranes were maintained in this solution all night at 37 °C with SA in a Hybaid™ hybridation oven. The next day, the membranes were washed with 6X SSC at RT for 5 min in SA and twice with 4X SSC containing 0.1% SDS at 45 °C for 10 min (probes 0, I, II, III, and VI) and at 55 °C for 10 min (probe V). Additionally, two washings were made with maleate solution 1M pH 7.5 and 0.3% Tween for 15 min and one with maleate solution for 5 min. For the development of the membranes, a solution was added with the antibody anti-digoxigenine conjugated with alkaline phosphatase (Roche™) (dilution of 1/10000) and were incubated for 30 min to TA, then were washed twice for 15 min with maleate solution and 0.3% tween, and finally with 20 ml of Tris-NaCl pH 9.5 for 5 min. The chemiluminescent detection was made with CSPD (Roche™) following the protocol of the manufacturer. The membranes were exposed to X ray films for 12 hours. Kodak® fixative was used to develop the films.

Cuadro 2. Sondas específicas para la diferenciación de aislamientos de CTV.
Table 2. Specific probes for the differentiation of CTV isolates.

Sonda	Secuencia	Tipo de aislamiento CTV que detecta
0	GGATCGATGTGTAA	Universal
I	GAAATCCGCACACAAGT	T-36 y otros (declinamiento rápido)
II	TGACGCACGTCATTCAT	B-53 y otros (picadura de tallo)
III	CCACTTCGACGCCCT	B-185, B-165, B-7 (declinamiento y picadura)
V	ACACCCGTGGTATCATCGT	B-128, B-249 (picadura de tallo)
VI	CCGCTAATCGGTATA	T-30 y otros (aislamientos moderados de Florida)

solución de maleato y 0.3% tween, y finalmente con 20 ml de Tris-NaCl pH 9.5 por 5 min. La detección quimioluminiscente se realizó con CSPD (Roche™) siguiendo el protocolo del fabricante. Las membranas se expusieron a películas de rayos X por 12 horas. Para el revelado de las películas se usó revelador y fijador Kodak®.

Análisis de datos

Para comparar las regiones se construyó [con vectores de presencia (1) y ausencia (0) de señal de hibridación y de bandas de SSCP] dos matrices a partir del coeficiente de Nei y Li. Con cada una de las matrices se generaron dendrogramas por el método de promedio aritmético de grupos de pares no ponderados (UPGMA) con el programa NTSYSpc ver. 2.10L. Para cada caso se hizo un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En Brasil todos los árboles son preinmunizados con un aislamiento moderado de CTV, por lo que se esperaba que la totalidad de las muestras (500) sometidas a RT-PCR amplificaran el fragmento correspondiente al tamaño de la CP (672 pb) (Huang *et al.* 2004). Sin embargo, sólo 96 muestras lo amplificaron (Cuadro 3). Ésto pudo deberse a que la época de toma de muestras no fue la adecuada (septiembre), ya que no se recomienda realizar el muestreo en épocas muy cálidas porque se limita la replicación (Cambra *et al.* 2000), o debido a que el ARN tuviera contaminantes que inhibieron la reacción de PCR, e.g. polisacáridos o fenoles (P. Moreno⁷, comunicación personal). Por otro lado, en las huertas ubicadas en Capela do Alto, Capão Bonito y Botucatu, la calidad del material vegetal recolectado no fue óptima, debido a que tenían un estrés hídrico evidente, por un manejo menos tecnificado, comparado con las huertas de MG y que corresponden con el menor número de muestras amplificadas con HCP1/HCP2 (Cuadro 3). Por la gran heterogeneidad de aislamientos presentes en Brasil (Müller *et al.*, 2000) es posible que los iniciadores utilizados seleccionen sólo algunos haplotipos, subestimando la diversidad genética presente en la región. Ésto se ha confirmado con aislamientos de California (Kong *et al.*, 2000).

El porcentaje de hibridación con las sondas específicas en regiones con y sin MSC fue 79.60% y 84.67% (Cuadro 3).

La mayor variabilidad entre aislamientos de CTV dentro de las poblaciones puede ser explicada por los cambios de las poblaciones del virus dentro del árbol

Analysis of data

To compare the regions, two matrices were constructed [(with vectors of presence (1) and absence (0) of hybridization bands and SSCP bands)] base on the coefficient of Nei and Li. Dendrograms were generated with each one of the matrices by the arithmetic average method of unweighted groups of pairs (UPGMA), with the program NTSYSpc ver. 2.10L. For each case an analysis of molecular variance (AMOVA) was made with the program GenAlEx6 (Peakall and Smouse, 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

In Brazil, citrus trees are pre-immunized with a moderate isolate of CTV, thus it was expected that all of the samples (500) subjected to RT-PCR would amplify the fragment corresponding to the size of the CP (672 pb) (Huang *et al.*, 2004). However, only 96 samples amplified it (Table 3). This may be due to the fact that the sample collecting period (September), was not adequate given that it is not recommendable to carry out the sampling during very hot periods because replication is limited (Cambra *et al.*, 2000), or because the RNA may have had contaminants that inhibited the reaction of PCR, e.g. polysaccharides or phenols (P. Moreno⁷, personal communication). On the other hand, in the groves located in Capela do Alto, Capão Bonito and Botucatu, the quality of the vegetable material collected was not optimum, as it presented evident water stress due to a less technified management compared with the groves of MG and that correspond to the lower number of samples amplified with HCP1/HCP2 (Table 3). Because of the great heterogeneity of isolates present in Brazil (Müller *et al.*, 2000), it is possible that the primers that were used select only certain haplotypes, sub-estimating the genetic diversity present in the region. This has been confirmed with isolates from California (Kong *et al.*, 2000).

The percentage of hybridation with the specific probes in regions with and without MSC was 79.60% and 84.67%, respectively (Table 3).

The greater variability among isolates of CTV within the populations can be explained by the changes of the populations of the virus within the tree as a result of the frequent inoculations by the vector aphids present (Weng *et al.*, 2007; Sentandreu *et al.*, 2006). With the 0 probe (universal), 55/65 samples hybridized, however, the other 10 samples hybridized with some other probe. In contrast, with this same probe in absence of MSC, 29/31 samples hybridized (Table 3), which suggests

⁷ Pedro Moreno. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Carretera Moncada - Náquera, Km. 4,5 Moncada (Valencia), España. (pmoreno@ivia.es)

Cuadro 3. Muestras amplificadas con iniciadores HCP1/HCP2 (672 pb) para la capa proteica del CTV e hibridación con sondas específicas en la diferenciación de aislamientos de CTV presentes en regiones con y sin muerte súbita de los cítricos en Brasil.

Table 3. Samples amplified with primers HCP1/HCP2 (672 pb) for the coat protein of CTV and hybridation with specific probes in the differentiation of CTV isolates present in regions with and without citrus sudden death in Brazil.

Localidad y Estado	Muestras amplificadas con HCP1/HCP2	Muestras hibridadas por sonda					
		Muestras totales amplificadas por huerta					
		0	I	II	III	V	VI
Ausencia de muerte súbita de los cítricos							
Capela do Alto, SP	5	5/5	4/5	4/5	5/5	5/5	0/5
Capão Bonito, SP	6	6/6	5/6	6/6	6/6	6/6	0/6
Botucatu, SP	20	18/20	13/20	16/20	16/20	19/20	0/20
Subtotal	31	29/31	22/31	26/31	27/31	30/31	0/31
Presencia de muerte súbita de los cítricos							
Comendador Gomes, MG	32	30/32	25/32	15/32	27/32	27/32	0/32
Uberlândia, MG	33	25/33	18/33	31/33	32/33	32/33	0/33
Subtotal	65	55/65	43/65	46/65	59/65	59/65	0/65
TOTAL	96	84/96	65/96	71/96	86/96	89/96	0/96

como consecuencia de las frecuentes inoculaciones de áfidos vectores presentes (Weng *et al.*, 2007; Sentandreu *et al.*, 2006). Con la sonda 0 (universal), 55/65 muestras hibridaron; sin embargo, las 10 muestras restantes hibridaron con alguna otra sonda. En contraste, con esta misma sonda en ausencia de MSC, hibridaron 29/31 muestras (Cuadro 3), lo que sugiere que, aunque la sonda fue diseñada a partir de diversos aislamientos de diferentes regiones geográficas del mundo, puede no ser absolutamente universal para las condiciones específicas de Brasil, considerando en especial la presión de inóculo, la dinámica poblacional de áfidos vectores, en especial *Toxoptera citricida*, así como las condiciones climáticas (Souza *et al.*, 2002).

Debido a que una muestra puede exhibir poblaciones complejas de mezclas de diferentes genotipos virales de CTV, no es extraño que este resultado se deba a diversos eventos de recombinación, es decir procesos de inserción de segmentos de información genética entre las cadenas de nucleótidos de diferentes variantes génicas durante el proceso de replicación (Weng *et al.*, 2007; García-Arenal *et al.*, 2001).

La asociación de sintomatología atribuible a aislamientos severos de CTV con MSC no fue determinante. Se obtuvo menor número de muestras hibridadas para la sonda I (declinamiento rápido) y II (picado de tallo), en Comendador Gomes (25/32 y 15/32) y Uberlândia con presencia del MSC (18/33 y 31/33) (Cuadro 3).

La no hibridación con la sonda VI (específica para los aislamientos tipo T-30 y otros no severos de Florida)

that, although the probe was designed from diverse isolates of distinct geographical regions of the world, it may not be absolutely universal for the specific conditions of Brazil, especially considering the pressure of the inoculum, the population dynamic of vector aphids, especially *Toxoptera citricida*, as well as the climatic conditions (Souza *et al.*, 2002).

Because a sample may exhibit complex populations of mixtures of different viral genotypes of CTV, it is not surprising that this result is due to diverse events of recombination, that is, processes of insertion of segments of genetic information among the chains of nucleotides of different genic variants during the replication process (Weng *et al.*, 2007; García-Arenal *et al.*, 2001).

The association of symptomatology associated to severe isolates of CTV with MSC was not established. A smaller number of hybridized samples was obtained for probe I (quick decline) and II (stem pitting), in Comendador Gomes (25/32 and 15/32) and Uberlândia with presence of MSC (18/33 and 31/33) (Table 3).

The lack of hybridation with probe VI (specific for the T-30 type isolates and other non severe isolates of Florida) may be due to the fact that this type of isolate is found related to those of Asian origin such as Taiwan (B252), as well as Colombia (B272) and California (B354) (Roischaster and Moreno, 1991) and not to those of Brazil. The molecular variance analysis (AMOVA) gave 91% variability within populations and 9% variability among regions with and without CSD (Table 4), which indicates a complex heterogeneity and

puede deberse a que este tipo de aislamiento se encuentra relacionado con otros de origen asiático como de Taiwán (B252), además de Colombia (B272) y California (B354) (Roischaster y Moreno, 1991) y no con los de Brasil. El análisis de varianza molecular (AMOVA) calculado dió 91% de variabilidad dentro de poblaciones y 9% de variación entre regiones con y sin MSC (Cuadro 4), lo cual indica una compleja heterogeneidad e interacción entre los aislamientos de CTV presentes en la muestra (que corresponde a una planta), lo que limita el reconocimiento de los sitios de alineamiento de las sondas.

El dendrograma construido con una matriz de datos de ausencia/presencia de señal de hibridación generó 2 grupos, de los cuales uno incluye casi todas las muestras (93) (Figura 1), con un coeficiente de similitud de 0.63; 62/65 muestras con MSC se agruparon con condición severa o moderada. Por tanto no hubo una asociación clara entre la sintomatología atribuida a aislamientos severos de CTV y MSC. Sin embargo, sí se puede asociar la MSC con el CTV, ya que no están en grupos distintos (Figura 1).

El resultado del análisis de SSCP de una porción del gen p25 de la CP mostró patrones complejos en las cinco localidades. El número de bandas varía de dos a catorce (Figura 2). Se considera que cada banda corresponde a una cadena del DNA dúplex, lo que indica que existe una combinación de hasta siete haplotipos en cada aislamiento. El número de haplotipos en regiones con MSC fue 5 o más y en regiones sin MSC fue hasta 7. Esto confirma la existencia de una interacción compleja entre los aislamientos presentes y su hospedante, que pueden cambiar en el tiempo y espacio a una mezcla de aislamientos con diferentes niveles de severidad (Souza *et al.*, 2002; Corazza-Nunez *et al.*, 2001), pero que hasta el momento no se puede implicar a aislados severos del CTV con la etiología de la MSC.

En el análisis de varianza molecular (AMOVA) de los patrones electroforéticos de SSCP se calculó una variación de 98% dentro de poblaciones de las cinco regiones estudiadas, lo que explica que no se encontró

interacción among the isolates of CTV present in the sample (which corresponds to one plant), which limits the recognition of the alignment sites of the probes.

The dendrogram constructed with a matrix of data of absence/presence of hybridization bands generated 2 groups, one of which includes nearly all of the samples (93) (Figure 1), with a similarity coefficient of 0.63; 62/65 samples with MSC were grouped with severe or moderate condition. Therefore, there was not a clear association between the symptomatology attributed to severe isolates of CTV and CSD. However, CSD can be associated with CTV, because they are not in different groups (Figure 1).

The result of the analysis of SSCP of a portion of gene p25 of the CP showed complex patterns in the five localities. The number of bands varies from two to fourteen (Figure 2). It is considered that each band corresponds to a chain of the duplex DNA, which indicates that there is a combination of as many as seven haplotypes in each isolate. The number of haplotypes in regions with MSC was 5 or more and in regions without MSC it was as many as 7. This confirms the existence of a complex interaction between the isolates present and their host, which can change in time and space to a mixture of isolates with different levels of severity (Souza *et al.*, 2002; Corazza-Nunez *et al.*, 2001), but up to now severe isolates of CTV can not be implicated with the etiology of CSD.

The analysis of molecular variance (AMOVA) of the electrophoretic patterns of SSCP calculated a variation of 98% within populations of the five regions studied, which explains that no predominant pattern was found. The little variability among regions (2%) indicates a local heterogeneous population structure (Table 5).

The dendrogram of data of absence/presence of bands of the SSCP (results not shown), presents two groups, without a clear differentiation of geographic regions, and therefore, of symptomatology, with which the heterogeneity of the population structure in the five geographic regions is confirmed, along with the non implication of severe isolates in the CSD (Table 5).

Cuadro 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) del perfil electroforético de SSCP de muestras amplificadas con parte del gen p25 de la capa proteica de aislamientos de CTV de cinco regiones geográficas de Brasil.

Table 4. Analysis of molecular variance (AMOVA) of the electrophoretic SSCP pattern profile of samples amplified with part of the p25 gene of the coat protein of CTV isolates from five geographic regions of Brazil.

Fuentes de variación	gl [†]	Estimadores de varianza	% de variación	Significancia [‡]
Entre regiones geográficas	4	0.055	9.0	0.0892
Dentro de regiones geográficas	92	3.562	91.0	---

[†] Grados de libertad.

[‡] Probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de ρ *stat* más extremos que los observados.

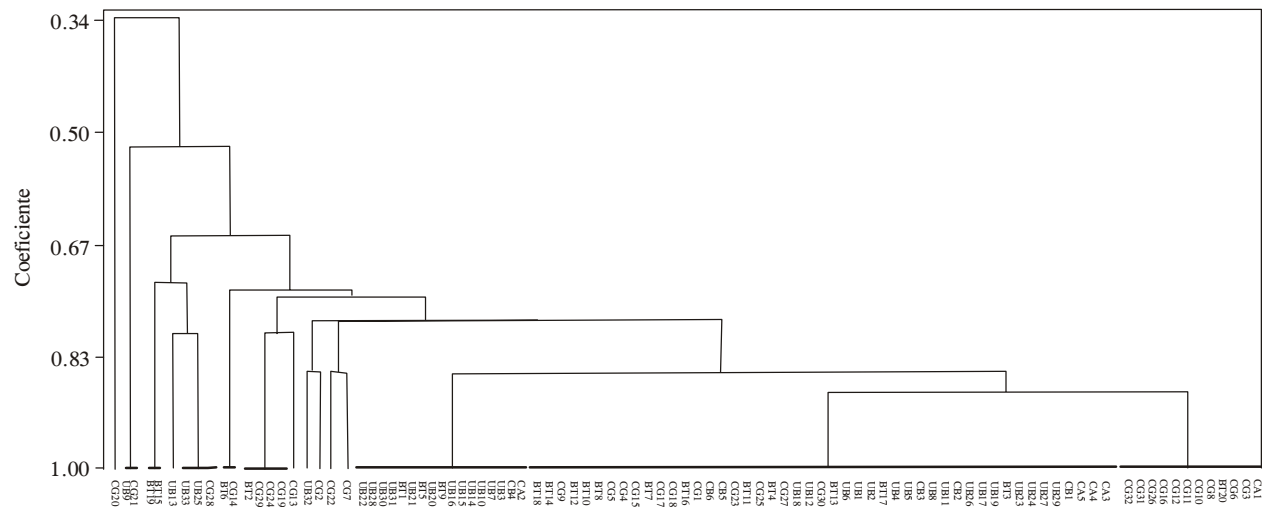


Figura 1. Dendrograma obtenido de 96 muestras de CTV con y sin presencia de MSC que se hibridaron con sondas específicas para la diferenciación de aislamientos de CTV de Brasil (Comendador Gomes: CG, Uberlândia: UB); picado de tallo (Capela do Alto: CA); presencia de aislamientos severos (Capão Bonito: CB); aislamientos moderados (Botucatu: BT).

Figure 1. Dendrogram obtained from 96 samples of CTV with and without presence of CSD that were hybridized with specific probes for the differentiation of CTV isolates of Brazil (Comendador Gomes: CG, Uberlândia: UB); stem pitting (Capela do Alto: CA); presence of severe isolates (Capão Bonito: CB); moderate isolates (Botucatu: BT).

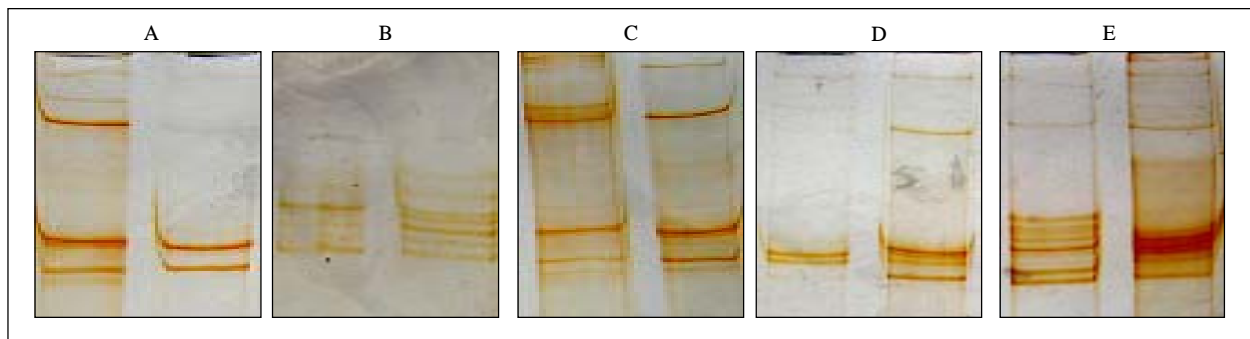


Figura 2. Patrones electroforéticos obtenidos de muestras de CTV por SSCP amplificadas de una porción de la capa proteica (p25) de cinco localidades de Brasil: A) Capela do Alto; B) Capão Bonito; C) Comendador Gomes; D) Uberlândia y E) Botucatu.

Figure 2. Electrophoretic patterns obtained from CTV samples by SSCP amplified from a portion of the coat protein (p25) from five localities of Brazil: A) Capela do Alto; B) Capão Bonito; C) Comendador Gomes; D) Uberlândia and E) Botucatu.

ningún patrón predominante. La poca variabilidad entre regiones (2%) indica una estructura poblacional heterogénea local (Cuadro 5).

El dendrograma de datos de ausencia/presencia de bandas del SSCP (resultados no mostrados), presenta dos grupos, sin una clara diferenciación de regiones geográficas y, por tanto, de sintomatología, con lo cual se confirma la heterogeneidad de la estructura poblacional en las cinco regiones geográficas y la no implicación de aislados severos en la MSC (Cuadro 5).

CONCLUSIONES

La hibridación con sondas específicas y el análisis de SSCP de aislamientos de CTV, detectó la existencia

CONCLUSIONS

Hybridation with specific probes and the analysis of SSCP of isolates of CTV, detected the existence of mixtures of different viral genotypes in the tree populations studied. Although the higher variability within populations (91 and 98%) than among regions is compatible with the possible appearance of an isolate of CTV with capacity to induce new high intensity epidemics and that can explain the localization of CSD in the state of Minas Gerais and its absence in other citrus regions of Brazil, CTV can not be conclusively implicated with CSD.

Hybridation with severe type probes was practically the same in regions with and without MSC, which

Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) del perfil electroforético SSCP de la capa proteica (p25) de aislamientos de CTV de cinco regiones de Brasil.**Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) of the electrophoretic SSCP pattern profile SSCP of the coat protein (p25) of CTV isolates from five regions of Brazil.**

Fuentes de variación	gl [†]	Estimadores de varianza	% de variación	Significancia [‡]
Entre regiones geográficas	4	0.055	2.0	0.270
Dentro de regiones geográficas	23	3.573	98.0	---

[†]Grados de libertad.

[‡]Probabilidad de ocurrencia de valores de varianza de ϕ *stat* más extremos que los observados.

de mezclas de diferentes genotipos virales en las poblaciones de árboles estudiados. Aunque la mayor variabilidad dentro de poblaciones (91 y 98%) que entre regiones es compatible con la posible aparición de un aislamiento de CTV con capacidad para inducir nuevas epidemias de alta intensidad y que puede explicar la localización de la MSC en el estado de Minas Gerais y su ausencia en otras regiones cítricas de Brasil, no se puede implicar al CTV con la MSC de manera concluyente.

La hibridación con sondas de tipo severo fue prácticamente igual en regiones con y sin MSC, lo que no permite asociar específicamente aislamientos severos de CTV con MSC, pero sí la asociación general de CTV a un nivel de 63% de similaridad poblacional. No se descarta la existencia de una nueva variante distante de las secuencias de CTV presentes en Brasil, por lo que se recomienda diseñar sondas asociadas a sintomatología atribuible a CTV a partir de aislamientos endémicos de Brasil.

AGRADECIMIENTOS

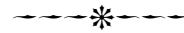
Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) en México y FUNDECITRUS A.C. en Brasil por el financiamiento respectivo.

LITERATURA CITADA

- Bassanezi, R. B., A. Bergamin-Filho, L. Amorim, N. Gimenes-Fernandes, T. R. Gottwald, and J. M. Bové. 2003. Spatial and temporal analyses of citrus sudden death as a tool to generate hypotheses concerning its etiology. *Phytopathology* 93: 502-512.
- Beidler, L. L., P. R. Hiliard, and R. L. Rill. 1982. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Analytical Biochemical* 126: 374-380.
- Cambra, M., M. T. Gorris, C. Marroquín, M. P. Román, A. Olmos, M. C. Martínez, A. Hermoso de Mendoza, A. López, and L. Navarro. 2000. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian community of Spain. *Virus Research* 71:85-95.
- Cevick, B., S. S. Pappu, R. F. Lee, and C. L. Niblett. 1996. Detection and differentiation of citrus tristeza closterovirus using a point mutation and minor sequences differences in their coat protein genes. *Phytopathol.* 86, S101.
- Corazza-Nunez, M. J., M. A. Machado, G. W. Müller, D. R. Stach-Machado, A. A. de Souza, W. M. de C. Nunez. 2001. Evaluation of Citrus tristeza virus (CTV) complexes in pre-immunized Marsh seedless grapefruits. *Summa Phytopatologica* 27:11-16.

does not allow the specific association of severe isolates of CTV with CSD, but it does allow the general association of CTV at a level of 63% of population similarity. The existence of a new distant variant of the sequences of CTV present in Brazil is not discarded, therefore it is recommended to design probes associated with the symptomatology attributable to CTV from endemic isolates of Brazil.

End of the English version—



- García-Arenal, F., A. Fraile, and J. M. Malpica. 2001. Variability and Genetic structure of plants virus populations. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 157-186.
- Huang, Z., P. A. Rundell, X. Guan, and P. A. Powell. 2004. Detection and isolate differentiation of citrus tristeza virus in infected field trees based on reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 88: 625-629.
- Jesus-Junior, W. C., and R. B. Bassanezi. 2004. Análise da dinâmica e estrutura de focos da morte súbita dos citros. *Fitopatologia Brasileira* 29:399-405.
- Kong, P., L. Rubio, M. Polek, and B.W. Falk. 2000. Population structure and genetic diversity of California citrus tristeza virus (CTV) field isolates. *Virus Genes* 21: 139-145.
- Müller, G. W., M. L. Targon, and M. A. Machado. 2000. Thirty years of preimmunized pera sweet orange in the citricultura in São Paulo State, Brazil. *In: Proceedings of the 14th Conference of IOCV.* Riverside, CA. pp: 400-403.
- Peakall, R., and P.E. Smouse. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288.
- Roistacher, C. N., and P. Moreno. 1991. The worldwide threat from destructive isolates of Citrus tristeza virus. A review. *In: Proceedings of the 11th Conference of IOCV.* Riverside, CA. pp: 1-19.
- Sentandreu, V., J. A. Castro, M. A. Ayllón, L. Rubio, J. Guerri, F. González-Candelas, P. Moreno and A. Moya. 2006. Evolutionary analysis of genetic variation observed in citrus tristeza virus (CTV) after host passage. *Arch. Virol.* 151:875-894.
- Souza, A. A., G. W. Müller, M. L. Targon, M. A. Takita, and M. Machado. 2002. Stability of the Mild Protective "PIAC" Isolate of Citrus Tristeza Virus. *In: Proceedings of the 15th Conference of IOCV.* Riverside, CA. pp: 131-135.
- Weng, Z., R. Barthelson, S. Gowda, M.E. Hilf, W.O. Dawson, D.W. Galbraith, and Z. Xiong. 2007. Persistent infection and promiscuous recombination of multiple genotypes of an RNA virus within a single host generate extensive diversity. *PLoS ONE* 2(9): e917. doi:10.1371/journal.pone.0000917.