

ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA EN POMELO Y LIMÓN MEXICANO TRANSFORMADOS CON EL GEN p25 DEL *Citrus tristeza virus*

RESISTANCE ANALYSIS IN GRAPEFRUIT AND MEXICAN LIME TRANSFORMED WITH the p25 *Citrus tristeza virus* GEN

Emiliano Loeza-Kuk^{1*}, María A. Gutiérrez-Espinosa², Daniel L. Ochoa-Martínez³, Ángel Villegas-Monter², Gustavo Mora-Aguilera³, Elvia C. Palacios-Torres³, Eugenio Pérez-Molphe-Balch⁴

¹Campo Experimental Mochochá, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 97454. Km. 25 Carretera Mérida-Motul, Yucatán. ²Programa de Fruticultura y ³Fitopatología, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. (loeza.emiliano@inifap.gob.mx) (alexge@colpos.mx). ⁴Universidad Autónoma de Aguascalientes. Avenida Universidad 940. 20100. Aguascalientes, México.

RESUMEN

En el manejo de la tristeza de los cítricos se ha recurrido a patrones tolerantes, pero tienen menor plasticidad que *C. aurantium* y la protección cruzada es superada en ocasiones por variantes más severas. Una alternativa puede ser plantas transgénicas con resistencia derivada del patógeno (PDR por sus siglas en inglés). Para evaluar la PDR conferida con la transgénesis plantas de *Citrus paradisi* y *C. aurantifolia*, transformadas vía *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes* con el gen p25 del *Citrus tristeza virus* (CTV), fueron multiplicadas en *C. aurantium* y *C. volkameriana* e inoculadas por injerto y transmisión con *Aphis gossypii* con aislamientos mexicanos de CTV para determinar su resistencia. El diseño experimental usado fue completamente al azar en un arreglo factorial con tres repeticiones por tratamiento. El comportamiento de las plantas, evaluado por PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18, indicó que 90 d después de la inoculación las transgénicas de *C. paradisi* tuvieron menor concentración del virus que las no transformadas, mientras que *C. aurantifolia* permitió una replicación similar a las plantas no transformadas. Comportamiento similar se observó *in vitro* con los mismos materiales. El análisis de los resultados sugiere una posible resistencia derivada del patógeno en las líneas de pomelo transgénicas evaluadas.

Palabras clave: resistencia derivada del patógeno, cítricos transgénicos, PCR tiempo real, cuantificación viral.

ABSTRACT

In citrus tristeza management tolerant rootstocks have been used, but have less plasticity than *C. aurantium*, and cross-protection sometimes is overcome by more severe variants. An alternative may be transgenic plants with pathogen-derived resistance PDR. To evaluate the conferred PDR with transgenesis plants of *Citrus paradisi* and *C. aurantifolia*, transformed via *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes* with the p25 gene of the *Citrus tristeza virus* (CTV), were multiplied in *C. aurantium* and *C. volkameriana* and inoculated by grafting and with *Aphis gossypii* using Mexican isolates of CTV to determine their resistance. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement with three replicates by treatment. The plant behavior, evaluated by real-time PCR with SYBR[®] Green for the p18 gene, indicated that 90 d after inoculation, the *C. paradisi* transgenics had lower virus concentration than those non-transformed, while *C. aurantifolia* allowed replication similar to non-transformed plants. Similar behavior was observed *in vitro* with the same materials. The analysis of results suggest a possible pathogen-derived resistance in the transgenic grapefruit lines evaluated.

Key words: pathogen-derived resistance, transgenic citrus, real-time PCR, viral quantification.

INTRODUCTION

The genetic transformation of citrus species in order to confer resistance to *Citrus tristeza virus* (CTV) is an option to conventional improvement due to the control in the process of incorporating a gene of interest (Gutiérrez-E. *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo,

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Febrero, 2010. Aprobado: Enero, 2011.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 45: 55-65. 2011.

INTRODUCCIÓN

La transformación genética de especies cítricas, con el propósito de conferir resistencia al *Citrus tristeza virus* (CTV), es una opción para el mejoramiento convencional debido al control en el proceso de incorporación de un gen de interés (Gutiérrez-E. *et al.*, 1997; Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo, 1998; Domínguez *et al.*, 2002). Por razones de bioseguridad, la evaluación de la resistencia en transgénicos se ha realizado en condiciones confinadas, lo que limita reproducir el proceso natural de infección por vectores y controlar la carga de inóculo vía injerto. En consecuencia, los resultados no han sido concluyentes y la posible resistencia conferida es superada debido al método de inoculación (Domínguez *et al.*, 2002; Febres *et al.*, 2008).

En México, el uso de materiales transgénicos está sujeto a regulación oficial (Diario Oficial de la Federación, 2005). Por tanto, una alternativa para evaluar la PDR conferida es la cuantificación de la expresión del gen de interés por medio de técnicas moleculares específicas o por métodos cuantitativos.

El grupo interdisciplinario de cítricos del Colegio de Postgraduados ha generado plantas transgénicas con el gen p25, doble construcción de las expresiones proteicas p25 y p27, y el extremo 3' tanto en sentido como en antisentido del genoma del CTV (Palacios-Torres *et al.*, 2001), las cuales se han corroborado mediante PCR y análisis Southern pero no en condiciones de infección inducida. El objetivo de este estudio fue evaluar la resistencia a la infección/replicación del CTV en plantas transformadas genéticamente con el gen p25 (capa proteica) en dos líneas de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) cv. Star Ruby y una selección de limón mexicano [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swing] mediante injerto y el vector *Aphis gossypii*, usando PCR en tiempo real para cuantificar el nivel replicativo del virus. La hipótesis fue que las plantas transgénicas podrán impedir o reducir la replicación del CTV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material evaluado

Segmentos de plántulas de pomelo cv. Star Ruby se inocularon con la cepa EHA 101 de *Agrobacterium tumefaciens*, la

1998; Domínguez *et al.*, 2002). For bio-security reasons, evaluation of transgenic resistance has been carried out in confined conditions, which do not reproduce the natural process of infection by vectors and fails to control the inoculum load via grafting. Consequently, results have been inconclusive and the possible resistance conferred is overcome due to the method of inoculation (Domínguez *et al.*, 2002; Febres *et al.*, 2008).

In México, the use of transgenic materials is regulated by official policies (Diario Oficial de la Federación, 2005). As an alternative to evaluate the conferred PDR is the quantification of the expression of the gene of interest by using specific molecular techniques or by quantitative methods.

The interdisciplinary group of citrus of the Colegio de Postgraduados has generated transgenic plants with the p25 gene, double construction of the protein expressions p25 and p27, and the 3' end in both sense and antisense of the CTV genome (Palacios-Torres *et al.*, 2001). These plants have been corroborated through PCR and Southern analysis but not under conditions of induced infection. The aim of this study was to evaluate the resistance to infection/replication of CTV in genetically transformed plants with the p25 gene (coat protein) in two lines of grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) cv. Star Ruby and a selection of Mexican lime [*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swing] by grafting and the vector *Aphis gossypii*, using real-time PCR to quantify the replication level of virus. The hypothesis was that transgenic plants will be able to prevent or reduce the replication of CTV.

MATERIALS AND METHODS

Evaluated material

Segments of grapefruit seedlings cv. Star Ruby were inoculated with the EHA 101 strain of *Agrobacterium tumefaciens*, which included the plasmid pGA482GG with genes *gus*, *nptII*, *gentamicin*, and p25 of CTV obtained from the T-36 isolate of severe symptoms and native of Florida (Gutiérrez *et al.*, 1997). The regenerated shoots were evaluated to detect the transgenic ones (Palacios-Torres *et al.*, 2001).

Besides, Mexican lime segments were inoculated with the A4 strain of *A. rhizogenes* using the procedure of Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo (1998). In this case the strain included the binary plasmid pGA482GG-B249CP, with the

cual incluyó el plásmido pGA482GG con los genes *gus*, *nptII*, gentamicina y p25 del CTV obtenidos del aislamiento T-36 de sintomatología severa y originario de Florida (Gutiérrez *et al.*, 1997). Los brotes regenerados fueron evaluados para detectar los transgénicos (Palacios-Torres *et al.*, 2001).

Además, se inocularon segmentos de limón mexicano con la cepa A4 de *A. rhizogenes* mediante el procedimiento de Pérez-Molphe-Balch y Ochoa-Alejo (1998). En este caso la cepa incluyó el plásmido binario pGA482GG-B249CP, con los genes de *nptII*, *gus* y el gen p25 del aislamiento B-249 originario de Venezuela y que causa picado de tallo (Febres *et al.*, 2003).

De las plantas transgénicas obtenidas se eligieron dos líneas de pomelo cv. Star Ruby (CpP1 y CpP2) y una de limón mexicano (CpL) con acumulación de proteína producto del gen de la capa proteica y una copia de T-ADN detectados en análisis Western y Southern. Plantas de pomelo (P) y limón mexicano (L) sin transformar se incluyeron como testigos en el ensayo de inoculación. También se incluyeron testigos sin transformar y sin inocular de pomelo (Psi) y limón (Lsi).

Inoculación *in vitro* de plantas transgénicas

Un total de 60 explantes de CpP1, CpP2, CpL, P y L (12 secciones de tallo por cada uno), desinfectados, sin hojas y con una yema se sembraron en tubos con 50 mL de medio semisólido Murashige y Skoog (1962).

Una vez que se obtuvo la brotación, cada explante se inoculó por injerto de una porción de tallo de material infectado con aislamiento severo de CTV con baja prevalencia (GIIC-Tam1) y no severo de alta prevalencia (GIIC-Tam2) en Tamaulipas (Loeza-Kuk *et al.*, 2005). El material *in vitro* se incubó a 23-25 °C y 16 h luz. La evaluación de la transmisión del CTV fue 21 d después de la inoculación (DDI) por RT-PCR para p18 con ARN extraído de tejido de brotes provenientes de tallos con el injerto vivo. Luego, se retiró el segmento injertado en los explantes positivos y se evaluaron a los 60 DDI con RT-PCR y PCR en tiempo real.

Inoculación de plantas transgénicas en invernadero

La inoculación de plantas transgénicas se efectuó por injerto y con áfidos. Porciones de CpP1, CpP2, CpL, P y L fueron injertadas sobre *C. aurantium* y *C. volkameriana* y mantenidas en invernadero a 15 a 33 °C. Tres plantas de cada combinación con brotes de 30 a 50 cm se inocularon por injerto de corteza (0.5 cm²) de *Citrus sinensis* infectado con GIIC-Tam1 y GIIC-Tam2, según los tratamientos indicados en el Cuadro 1, con un diseño completamente al azar con arreglo factorial. La carga viral se determinó mediante PCR en tiempo real.

nptII, *gus* genes and the p25 gene of the B-249 isolate native from Venezuela which causes stem pitting (Febres *et al.*, 2003).

From the transgenic plants obtained, two lines of grapefruit cv. Star Ruby (CpP1 and CpP2) and one of a Mexican lime (CpL) were chosen with protein accumulation product of the coat protein gene and a copy of T-DNA detected in the Western and Southern analysis. Untransformed grapefruit (P) and Mexican lime (L) plants were included as controls in the test of inoculation. Control untransformed plants of grapefruit (Psi) and lime (Lsi) and without inoculation were also included.

***In vitro* inoculation of transgenic plants**

A total of 60 explants of CpP1, CpP2, CpL, P and L (12 stem segments each) disinfected, without leaves and with a bud were planted in tubes with 50 mL of semisolid medium Murashige and Skoog (1962).

Once shoots were developed, each explant was inoculated by grafting a stem segment of plant harbouring a severe isolate of CTV with low prevalence (GIIC-Tam1) and another mild isolate with high prevalence (GIIC-Tam2) in Tamaulipas (Loeza-Kuk *et al.*, 2005). The *in vitro* material was incubated at 23-25 °C and 16 h light. The evaluation of the transmission of CTV was 21 d after inoculation (DAI) by RT-PCR for p18, using as template RNA extracted from shoots tissue from stems with the grafting tissue alive. Subsequently, the segment grafted in the positive explants was withdrawn and at 60 DAI the explants were evaluated with RT-PCR and real-time PCR.

Inoculation of transgenic plants under greenhouse condition

Inoculation of transgenic plants was carried out by grafting and aphids. Portions of CpP1, CpP2, CpL, P and L were grafted on *C. aurantium* and *C. volkameriana* and maintained in greenhouse at 15 to 33 °C. Three plants of each combination with shoots of 30 to 50 cm were inoculated by bark grafting (0.5 cm²) of *Citrus sinensis* infected with GIIC-Tam1 and GIIC-Tam2, according to the treatments listed in Table 1, with a completely randomized design with a factorial arrangement. The viral load was determined by real-time PCR.

Aphis gossypii inoculation was carried out with 30 adult apterous, fed on *C. sinensis* infected with CTV and placed on each recipient plant with tender leaves; the viral load was quantified in parallel in groups of 30 aphids fed on the same viral source. Aphids were removed after 5 DAI with methyl parathion (2 mL L⁻¹). The inoculated plants were confined in the greenhouse.

Cuadro 1. Tratamientos para evaluar resistencia al *Citrus tristeza virus* en plantas transgénicas de pomelo y limón mexicano inoculados con dos aislamientos de CTV.

Table 1. Treatments to evaluate resistance to *Citrus tristeza virus* in transgenic plants of grapefruit and Mexican lime inoculated with two CTV isolates.

Materiales	Portainjerto			
	<i>C. aurantium</i> (Ca)		<i>C. volkameriano</i> (Cv)	
	Injerto(I)	Áfido (A)	Injerto	Áfido
CpP1 [†]	X	X	X	X
CpP2 [†]	X	X	X	X
Pomelo (P)	X	X	X	X
CpL [†]			X	X
Limón Mexicano (L)			X	X

[†] CpP1, CpP2 y CpL: pomelo cv. Star Ruby y limón mexicano transformados con el gen p25 del CTV; P y L: material no transformado
 ❖ CpP1, CpP2 and CpL: cv. Grapefruit Star Ruby and Mexican lime transformed with the p25 gene of CTV; P and L: untransformed material.

La inoculación con *Aphis gossypii* fue con 30 adultos ápteros, alimentados en *C. sinensis* infectadas con CTV y colocados en cada planta receptora con hojas tiernas; paralelamente se cuantificó la carga viral en grupos de 30 áfidos alimentados sobre la misma fuente viral. Los pulgones fueron eliminados a los 5 DDI con paratión metílico (2 mL⁻¹). Las plantas inoculadas se confinaron en invernadero.

Detección del CTV en plantas inoculadas en invernadero

A los 75 DDI se procesó tejido foliar para evaluar la efectividad de la inoculación por la multiplicación del virus. Se usó inmunocaptura-reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa (IC-RT-PCR) siguiendo el protocolo de Yokomi y DeBorde (2005), con los iniciadores p18f (5' TTCTATCGGGATGGTGGAGT3') y p18r (5' GACGAGATTATTACAACGG3') que flanquean al gen p18 del CTV (Sambade *et al.*, 2002). Después de sensibilizar y lavar los tubos, en cada uno se agregaron 45 µL de la mezcla de disrupción [50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs y 1 ng de cada iniciador] y se incubaron en el termociclador Touchgene Gradient (Techne) a 70 °C por 5 min. Después se enfriaron y se agregaron 5 µL de la mezcla: RNaseout 10U (Invitrogen), 50U de MMLV-RT y 1.25U de Taq DNA polimerasa (Promega Corp. Madison, WI). La RT-PCR se realizó con el siguiente programa: 1 h a 42 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 40 s a 74 °C seguidos de 5 min a 74 °C. Los productos de la reacción de 424 pb se visualizaron en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio en un fotodocumentador (UVP Epichem II) (Yokomi y DeBorde, 2005).

Detection of CTV in plants inoculated in greenhouse

At 75 DAI leaf tissue was processed to evaluate the effectiveness of inoculation by multiplication of virus. Immunocapture-reverse transcription- polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) was used following the protocol of Yokomi and DeBorde (2005), with the primers p18f (5' TTCTATCGGGATGGTGGAGT3') and p18r (5' GACGA-GATTATTACAACGG3') flanking the p18 gene of CTV (Sambade *et al.*, 2002). After tubes were coated and washed, each was added 45 µL of the mixture of disruption [50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs and 1 ng of each primer] and were incubated in the Techne Touchgene Gradient thermal cycler at 70 °C for 5 min. Then they were cooled and added 5 µL of the mixture RNaseout 10U (Invitrogen), 50U of MMLV-RT and 1.25U of Taq DNA polymerase (Promega Corp. Madison, WI). The RT-PCR was performed with the following program: 1 h at 42 °C, 35 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 40 s at 74 °C followed by 5 min at 74 °C. The reaction products of 424 bp were analyzed in 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide with an Epichem II Darkroom (UVP Imaging) (Yokomi and DeBorde, 2005).

Analysis of resistance

Once positive plants to transmission of CTV were detected, total RNA extraction with Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) from 100 mg of young shoots sampled at two sites of the plant canopy was carried out. The manufacturer's protocol was followed with an additional wash at 75 % ethanol and re-suspended in 50 µL of distilled water treated with 0.01 % diethylpyrocarbonate.

Análisis de resistencia

Una vez detectadas plantas positivas a la transmisión de CTV, se realizó la extracción de ARN total con Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) en 100 mg de brotes tiernos muestreados en dos sitios del dosel de la planta. Se siguió el protocolo del fabricante con un lavado adicional de etanol al 75 % y resuspendido en 50 μL de agua destilada tratada con dietilpirocarbano al 0.01 %.

El cADN se sintetizó con 4 μg de RNA cuantificado por UV-espectrofotometría (NanoDrop-1000 Spectrophotometer). El ARN cuantificado se estandarizó a 11 μL y se calentó 10 min a 70 °C junto con 10 mM de dNTPs y 500 ng de hexámeros aleatorios. Los tubos se colocaron en hielo y se adicionaron 7 μL de la mezcla de reacción para un volumen total de 20 μL que contenía 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 y 10 mM de DTT. Los tubos se incubaron a temperatura ambiente (20 °C) por 10 min y después por 50 min a 42 °C.

Para evaluar la replicación viral que permitió el material transgénico a través del número de copias de genomas virales presentes en las muestras, se elaboró una curva de estandarización externa con el producto de PCR del gen p18 purificado por columnas siguiendo el protocolo del fabricante (Qiaquick PCR Purification) y cuantificado por UV-espectrofotometría (Swillens *et al.*, 2004). Las diluciones seriales se realizaron con el programa MB Advanced DNA Analysis para determinar el peso de un pmol del fragmento en 0.258232 μg en su conformación bicatenaria (0.258232×10^{-12} g mol⁻¹), mismo que contuvo 1.555 $\times 10^{11}$ moléculas de acuerdo con la constante de Avogadro (6.023×10^{23} moléculas mol⁻¹). Con estos datos se aplicó la siguiente fórmula: (concentración en ng de la muestra UV-espectrofotometría \times pmoles μg^{-1}) / (1/1000 ng μL^{-1}) (número de partículas en 1 pmol), para determinar el número de partículas presentes en la muestra purificada y realizar las diluciones pertinentes para obtener concentraciones de 4×10^9 a 4×10^1 fragmentos de p18.

La PCR en tiempo real se realizó con el kit platinum SYBR green qPCR supermix UDG (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron 12.5 μL de SYBR mix, 0.5 μL del colorante ROX, 100 ng de iniciadores para p18 y 2 μL del producto de cADN por cada reacción en volumen de 25 μL . Las reacciones se hicieron en un termociclador Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). Los tubos estuvieron 2 min a 50 °C, 2 min a 95 °C, 35 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 55 °C y 40 s a 72 °C, 5 min a 72 °C y finalmente un calentamiento progresivo para generar una curva de disociación. En cada reacción, las muestras se analizaron por triplicado junto con una muestra de concentración conocida para ajustar la

The cDNA was synthesized with 4 μg of quantified RNA by an UV-spectrophotometry (NanoDrop-1000 Spectrophotometer). Quantified RNA was standardized at 11 μL and was heated at 70 °C for 10 minutes with 10 mM of dNTPs and 500 ng of random hexamers. The tubes were placed on ice and it was added 7 μL of the reaction mixture to obtain a total volume of 20 μL which contained 50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 and 10 mM of DTT. Tubes were incubated at room temperature (20 °C) for 10 min and later for 50 min at 42 °C.

To estimate the viral replication which allowed the transgenic material, through the number of copies of viral genomes present in the samples, a standard curve was prepared with the PCR product of the purified p18 gene by columns following the manufacturer's protocol (The QIAquick PCR Purification) and quantified by UV-spectrophotometry (Swillens *et al.*, 2004). The serial dilutions were carried out using the MB Advanced DNA Analysis program to determine the pmol weight of a fragment in 0.258232 μg in its double-stranded conformation (0.248232×10^{-12} g mol⁻¹, same that contained 1.555 $\times 10^{11}$ molecules according with the Avogadro constant (6.023×10^{23} molecules mol⁻¹). With these data the following formula was applied: (concentration in ng of the sample UV-spectrophotometry \times μ pmols⁻¹) / (1/1000 ng μL^{-1}) (number of particles in 1 pmol), to determine the number of particles present in the purified sample and making dilutions pertinent to obtain concentrations from 4×10^9 to 4×10^1 fragments of p18.

The real-time PCR was performed with Platinum SYBR green qPCR kit Supermix UDG (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. A mixture containing 12.5 μL of SYBR mix, 0.5 μL of ROX dye, 100 ng of primers for p18 and 2 μL of cDNA product for each reaction in a final volume of 25 μL were used. The reactions were done in a thermal cycler Rotor-Gene 3000 (Corbett Research). The tubes underwent cycles of 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C, 35 cycles of 15 s at 94 °C, 30 s at 55 °C and 40 s at 72 °C, 5 minutes at 72 °C and finally a gradual warming to generate a melting curve. In each reaction, samples were analyzed in triplicate together with a sample of known concentration to adjust the efficiency and use the parameters of the standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION

In the *in vitro* assay, 23 grafts (38 %) survived. Detection of CTV transmission by RT-PCR for p18 indicated 23 % of explants infected at 21 DAI. The positive ones in conventional RT-PCR were evaluated by real-time PCR. The standard curve indicated that up to 400 copies of p18 could be quantified

eficiencia y usar los parámetros de la curva de estandarización externa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el ensayo *in vitro*, sobrevivieron 23 injertos (38 %). La detección de la transmisión del CTV con RT-PCR para p18 indicó 23 % de explantes infectados a los 21 DDI. Los positivos en RT-PCR de punto final se evaluaron por PCR en tiempo real. La curva de estandarización indicó que se pudo cuantificar hasta 400 copias de p18 (número teórico de partículas virales, Figura 1). Con concentraciones menores la cuantificación no fue precisa. Este comportamiento pudo deberse a variaciones entre la alineación inicial de los iniciadores y de las secuencias objetivo (Wong and Medrano, 2005).

En otros estudios de cuantificación viral, los resultados fueron reproducibles y exactos, sin embargo, se usaron sondas Taqman (Olmos *et al.*, 2005) que poseen una especificidad mayor. Pero en la cuantificación del *Cucumber vein yellow virus* con SYBR-green, durante su replicación no se generan otros tipos de ARN (dRNAs, sgRNAs) como en el CTV (Hilf *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha cuantificado de este virus en plantas y áfidos con la región no traducible 3' (Bertolini *et al.*, 2008).

En este estudio, los brotes transgénicos y no transgénicos permitieron la replicación viral, aunque no se observaron síntomas imputables al virus. Sin embargo, el limón mexicano (L) y pomelo (P)

(theoretical number of viral particles, Figure 1). With lower concentrations quantification was not accurate. This behavior could be due to variations between the initial alignment of the primers and the target sequences (Wong and Medrano, 2005).

In other studies of viral quantification, results were reproducible and accurate, however, Taqman probes were used (Olmos *et al.*, 2005) that have greater specificity. But in the quantification of the *Cucumber vein yellow virus* with SYBR-green, during its replication does not generate other types of RNA (dRNAs, sgRNAs) as in the CTV (Hilf *et al.*, 1995). However, this virus has been quantified in plants and aphids with the untranslatable region 3' (Bertolini *et al.*, 2008).

In this study, the transgenic and non-transgenic shoots allowed viral replication, although no symptoms attributable to the virus were observed. However, Mexican lime (L) and grapefruit (P) had higher accumulation of viral chains than their transgenic counterparts (CpLNS and CpP1NS, Figure 2). The threshold cycle (Ct) of each group, decreased with days after inoculation (21 to 60 DAI). In some samples of CpP it was found that the concentration did not increase proportionally to higher DAI (Figure 2). In the uninoculated control (Lsi), Ct reduction was observed in fluorescence recorded by the device which corresponded to dimmers and not to amplification.

Under greenhouse conditions, due to the number of individuals not infected in two attempts

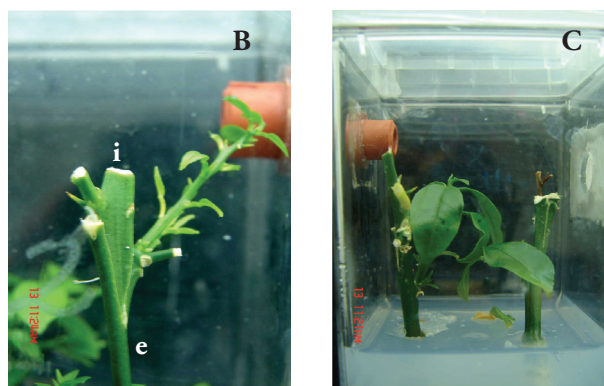
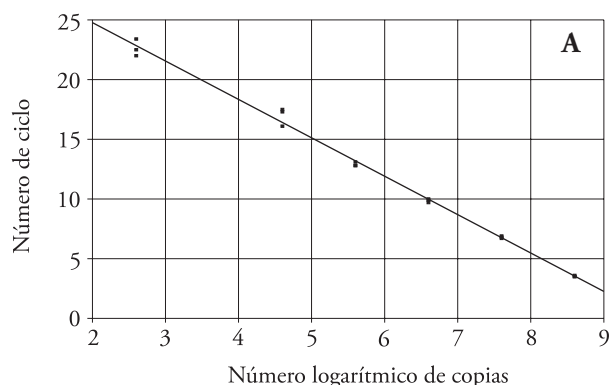


Figura 1. Amplificación a diferentes diluciones del gen p18 del *Citrus tristeza virus*. Las diluciones representan concentraciones de 4×10^2 a 4×10^8 amplificadas con SYBR-green en PCR en tiempo real (A). Explante de CpL inoculado con CTV (B). Explante de CpP1 inoculado con CTV (C). e: explante; i: inóculo.

Figure 1. Amplification at serial dilutions of p18 gene of *Citrus tristeza virus*. Dilutions represent concentrations of 4×10^2 to 4×10^8 amplified with SYBR-green in real time PCR (A). CpL explant inoculated with CTV (B). CpP1 explant inoculated with CTV (C). e: explant; i: inoculum.

tuvieron mayor acumulación de cadenas virales que sus contrapartes transgénicas (CpLNS y CpP1NS, Figura 2). El ciclo umbral de detección (Ct) de cada grupo disminuyó con los días después de la inoculación (de 21 a 60 DDI). En algunas muestras de CpP se detectó que la concentración no aumentó proporcionalmente a mayor DDI (Figura 2). En el testigo sin injertar (Isi), se observó reducción de Ct en la fluorescencia registrada por el aparato que correspondió a dímeros y no a amplificación.

En condiciones de invernadero, debido al número de individuos no infectados en dos intentos de inoculación, los resultados sólo se analizaron con los promedios y la desviación estándar. En este caso, la carga viral o número de copias de la porción injertada del aislamiento no severo y severo fue $4, 125, 443 \pm 1.04 \times 10^6$ y de $125, 215 \pm 2.91 \times 10^3$. En áfidos alimentados en plantas infectadas, la carga viral fue 27 y 64 copias para los aislamientos en el mismo orden. Sin embargo, la curva de disociación indicó que este último resultado no fue producto de amplificación.

Las dos líneas transgénicas de pomelo (CpP1 y CpP2) inoculadas por injerto acumularon menos partículas virales en ambos aislamientos que las plantas testigo (Cuadro 2). Esto sugiere que las plantas

of inoculation, the results were only analyzed with the averages and standard deviation. In this case, the viral load or number of copies of the grafted portion of non-severe and severe isolates was 4, 125, $443 \pm 104 \times 10^6$ and of $125, 215 \pm 2.91 \times 10^3$. In aphids fed on infected plants, viral load was 27 and 64 copies for the isolates in the same order. However, the melting curve indicated that this last result was not product of amplification.

The two transgenic lines of grapefruit (CpP1 and CpP2) inoculated by grafting accumulated less viral particles for both isolates than the control plants (Table 2); which suggest that transformed plants affect negatively the virus replication without having clear the mechanism of action. This result is consistent with that reported by Febres *et al.* (2008) in grapefruit plants inoculated with a severe isolate and confirmed by DAS-ELISA and RT-PCR.

The transgenic lime presented a lower concentration of viral particles than the non-transgenic lime; but the difference was smaller than in grapefruit. It is emphasized that the non-severe isolate had a higher accumulation in lime, possibly by absence of homology between the sequence inserted into the plant (p25 gene of T36) and that

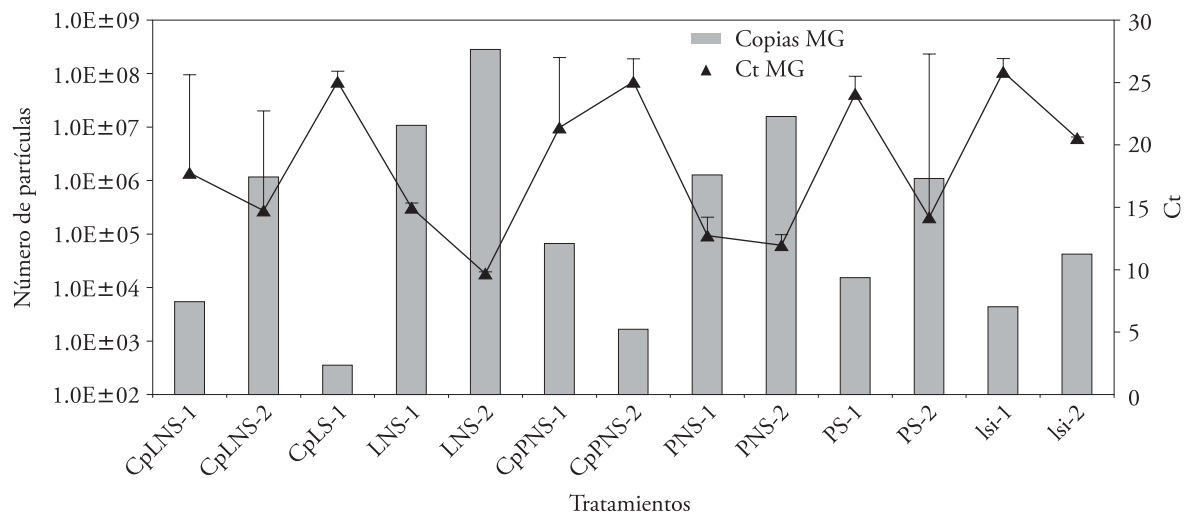


Figura 2. Número de cadenas (media geométrica de copias: copias MG) virales del CTV en líneas de pomelo (CpP) y limón mexicano transgénicas (CpL) y no transgénicas (P y L) inoculadas por injerto *in vitro* con un aislamiento severo (GIIC-Tam1;T1) y no severo (GIIC-Tam2;T2), determinadas por PCR en tiempo real con SYBR-green para el gen p18 del CTV a los 21 (1) y 60 (2) DDI. Isi: explante de limón sin injertar. Ct: ciclo umbral de detección.

Figure 2. Number of viral (geometric mean of copies: MG copies) strands of CTV in grapefruit (CpP) and Mexican lime (CpL) transgenic and non-transgenic lines (P and L) inoculated by grafting *in vitro* with a severe isolate (GIIC-Tam1;T1) and non-severe (GIIC-Tam2;T2), determined by real-time PCR with SYBR-green for the p18 gene of CTV at the 21 (1) and 60 (2) DAI. Isi: lime explants without grafting. Ct: threshold cycle.

transformadas afectan negativamente la replicación del virus sin tener claro el mecanismo de acción. Este resultado concuerda con lo reportado por Febres *et al.* (2008) en plantas de pomelo inoculadas con un aislamiento severo y confirmadas mediante DAS-ELISA y RT-PCR.

El limón transgénico presentó menor concentración de partículas virales que el limón no transgénico; pero la diferencia fue menor que en los pomelos. Destaca que el aislamiento no severo tuvo una acumulación mayor en el limón, posiblemente por ausencia de homología entre la secuencia inserta en la planta (gen p25 de T36) y la usada como inóculo (Tennant *et al.*, 2001). Otra posibilidad es la capacidad del virus de inducir una mayor replicación por su condición no severa de efecto no supresivo en el vigor de la planta, como lo sugieren las concentraciones de las fuentes de inóculo.

La falta de transmisión del virus por áfidos difiere de lo reportado por Domínguez *et al.* (2002), quienes

used as inoculum (Tennant *et al.*, 2001). Another possibility is the ability of the virus to induce a higher replication by its non-severe condition without a suppressive effect on the vigor of the plant, as suggested by the concentrations of the inoculum sources.

Lack of virus transmission by aphids differs from that reported by Domínguez *et al.* (2002), who effectively inoculated with *A. gossypii* using a larger number of aphids. The results show low transmissibility of the isolates of CTV by *A. gossypii* with the number of aphids used, although aphids were fed for eight days in plants positive to CTV, and access to host plants was five days.

The evaluation of PDR in citrus against CTV has been made in transformed plants of grapefruit with p25 of several isolates, Mexican lime with p25 (Domínguez *et al.*, 2002), grapefruit with p25 and the viral replicase (RNA polymerase-RNA dependent, RdRp) (Febres *et al.*, 2003; Febres *et al.*, 2008) and Mexican lime with p23 (Fagoaga *et al.*, 2006).

Cuadro 2. Concentración viral en pomelo y limón mexicano transgénicos inoculados por injerto con CTV, analizadas por PCR en tiempo real para el gen p18 a 60 y 90 DDI.

Table 2. Viral concentration in transgenic grapefruit and Mexican lime inoculated by grafting with CTV, analyzed by real-time PCR for the p18 gen at 60 and 90 DAI.

Materiales	Aislamiento no severo (GHC-Tam2)			
	60 DDI		90 DDI	
	Ct (MG) [†]	Copias	Ct (MG)	Copias
CpP1/Ca [‡]	24.4±0.2	7217±5272	24.4±1.1	3364±2.4×10 ³
CpP1/Cv	23.3±1.1	16001±15.7	24.1±0.5	4296±1.2×10 ³
CpP2/Ca	NC [§]	NC	24.2±1.1	692±4.292×10 ³
CpP2/Cv	18.0±0.1	727089±12.6	24.2±1.5	3383±3.6×10 ³
P/Ca	13.9±0.4	193298±28334	12.6±0.1	16131657±1423×10 ³
CpL/Cv	14.9±7.7	33374±7416049	9.1±0.8	230869522±78778×10 ³
L/Cv	24.1±0.4	134±16.7	6.6±0.1	1236671889±13003×10 ⁴
	Aislamiento severo (GHC-Tam1)			
CpP1/Ca	NC	NC	21.6±2.7	3595±43.4×10 ³
CpP1/Cv	23.6±0.4	1533±6026	21.3±1.8	40703±90.4×10 ³
CpP2/Ca	23.6±0.9	13418±5409	24.9±0.6	912±1.2×10 ³
CpP2/Cv	20.7±0.6	104588±26741	22.9±3.1	6817±40.5×10 ³
P/Ca	19.3	1153±17.7	24.8±0.8	3410±2.8×10 ³
P/Cv	NC	NC	25.4±0.9	1710±1.3×10 ³
CpL/Cv	16.3±8.3	40948±4431650	10.8±5.9	9461614±242393×10 ³
L/Cv	21.9±0.1	40251±720	8±0.1	1388256±162213×10 ³

[†] Ct(MG): media geométrica del ciclo umbral de detección. [‡] Portainjertos: Ca = *C. aurantium*, Cv = *C. volkameriana*. [§] NC = no cuantificados por resultar negativos en RT-PCR de punto final. [¶] Ct(MG): geometric mean of the threshold cycle. [¶] Rootstock: Ca = *C. aurantium*, Cv = *C. volkameriana*, [§] NC = not to be quantified by resulting negative in conventional RT-PCR.

inocularon eficientemente con *A. gossypii* con un mayor número de áfidos. Los resultados muestran baja transmisibilidad de los aislamientos de CTV por *A. gossypii* con el número de áfidos usados, aunque los áfidos se alimentaron ocho días en plantas positivas a CTV, y el acceso a las plantas receptoras fue cinco días.

La evaluación de PDR en cítricos contra el CTV se ha realizado en plantas transformadas de pomelo con p25 de varios aislamientos, limón mexicano con p25 (Domínguez *et al.*, 2002), pomelo con p25 y la replicasa viral (RNA polimerasa-RNA dependiente, RdRp) (Febres *et al.*, 2003; Febres *et al.*, 2008) y limón mexicano con p23 (Fagoaga *et al.*, 2006).

En este estudio, el efecto aditivo de combinar un patrón tolerante, como *Citrus volkameriana*, con un gen transgénico no fue conclusivo, ya que en general el número de partículas virales en esta combinación fue similar que con *Citrus aurantium*, altamente susceptible al virus. Como una respuesta a la inoculación, es posible que las plantas transgénicas con siete años de transformación incrementen la expresión del transgen de la capa proteica, mecanismo de defensa que no involucra el silenciamiento de ARN o silenciamiento pos-transcripcional (Al-Kaff *et al.*, 1998).

Asimismo, el tejido de plantas transformadas y sometidas al ensayo GUS antes de su inoculación, resultan positivas y no muestran silenciamiento de este gen después de seis años de su inserción (Domínguez *et al.*, 2002), un comportamiento detectado en las líneas evaluadas (datos no mostrados). Aunque las pruebas realizadas ofrecen resultados cuantitativos y valiosos, es necesario realizar otros análisis, como transferencia tipo Northern, antes y después de la inoculación para corroborarlos (Fagoaga *et al.*, 2006).

En este estudio, el PCR en tiempo real probó su factibilidad para discriminar niveles de tolerancia estimada a través de la cuantificación viral, por lo que su eficacia debe evaluarse incluyendo otras modalidades. Adicionalmente, la inoculación con distintas especies de áfidos, aislamientos múltiples y combinaciones virales podrían reforzar el proceso de evaluación de la transgenia.

Los resultados obtenidos con las plantas de limón mexicano, requerirán confirmaciones después de reevaluar la transgenia en los brotes sometidos. Sin embargo, en esta evaluación que incluyó componentes de un sistema complejo que opera en

In this study, the additive effect of combining a tolerant rootstock as *Citrus volkameriana*, with a transgenic gene was not conclusive, since in general the number of viral particles in this combination was similar to *Citrus aurantium*, highly susceptible to the virus. As a response to inoculation, it is possible that transgenic plants with seven years of transformation increase the expression of the coat protein transgene, defense mechanism that does not involve RNA silencing or post-transcriptional silencing (Al-Kaff *et al.*, 1998).

Besides, the tissue of transformed plants and tested to GUS assay prior to inoculation resulted positive and showed no silencing of this gene after six years of its insertion (Domínguez *et al.*, 2002), same behavior was detected in the lines evaluated (data not shown). Although the tests provide quantitative and valuable results, it is necessary to perform other analyses, as Northern assay, before and after inoculation to corroborate (Fagoaga *et al.*, 2006).

In this study, real-time PCR proved to be feasible to discriminate levels of estimated tolerance through the viral quantification, so its effectiveness should be evaluated including other modalities. Additionally, inoculation with different species of aphids, multiple isolates and viral combinations could enhance the evaluation process of the transgenics.

The results obtained with Mexican lime plants will require further confirmations after reevaluation of transgenic condition in the shoots. However, in this evaluation which included components of a complex system that operates in Mexico, such as Mexican isolates, vectors present and combination rootstock-scion, the behavior of the grapefruit to inoculation provides elements to continue the study of transgenic citrus in an eventual evaluation under field conditions, to detect a potential PDR for the conditions of México.

CONCLUSIONS

Grapefruit plants modified with the p25 gene of *Citrus tristeza virus* interfered with the replication and accumulation of this virus. The inoculation mediated by *Aphis gossypii* did not induce the viral infection due to low viral load. There was no additive effect between transgene expression and tolerance of *Citrus volkameriana*. The ability of multiplication

México, como son aislamientos mexicanos, vectores presentes y combinación portainjerto-variedad, el comportamiento de los pomelos a la inoculación aporta elementos que permitirán continuar el estudio de los cítricos transgénicos en una eventual evaluación en condiciones de campo, para detectar una PDR con potencial para las condiciones de México.

CONCLUSIONES

Las plantas de pomelo modificadas con el gen p25 del *Citrus tristeza virus* interfirieron con la replicación y acumulación de este virus. La inoculación mediada por *Aphis gossypii* no indujo la infección viral debido a una baja carga viral. No se encontró un efecto aditivo entre la expresión del transgen y la tolerancia de *Citrus volkameriana*. La capacidad de multiplicación y acumulación de partículas virales del *Citrus tristeza virus* es diferente entre aislamientos.

AGRADECIMIENTOS

A Beatriz Xoconostle, Instituto Politécnico Nacional. A Iván Córdoba, Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. A Vicente Febres, Universidad de Florida. Al Vivero Cazonas, Veracruz.

LITERATURA CITADA

- Al-Kaff S. N., N. S. Covey, M. M. Kreike, M. A. Page, R. Pinder, and J. P. Dale. 1998. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.
- Bertolini, E., A. Moreno, N. Capote, A. Olmos, A. de Luis, E. Vidal, J. Pérez-Panadés, and M. Cambra. 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time RT-PCR. *Eur. J. Plant Pathol.* 120: 177-178.
- Diario Oficial de la Federación, 2005. Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. México. 18 de marzo de 2005. 44 p.
- Domínguez, A., A. Hermoso de Mendoza, J. Guerri, M. Cambra, L. Navarro, P. Moreno, and L. Peña. 2002. Pathogen-derived resistance to citrus tristeza virus (CTV) in transgenic mexican lime (*Citrus aurantifolia* (Christ.)Swing.) plants expressing its p25 coat protein gene. *Molecular Breeding* 1: 1-10.
- Fagoaga, C., C. López, A. Hermoso de Mendoza, P. Moreno, L. Navarro, R. Flores, and L. Peña. 2006. Post-transcriptional gene silencing of the p23 silencing suppressor of Citrus tristeza virus confers resistance to the virus in transgenic Mexican lime. *Plant Molecular Biol.* 60: 153-165.

and accumulation of viral particles of *Citrus tristeza virus* is different among isolates.

—End of the English version—



- Febres, V. J., C. L. Niblett, R. F. Lee, and G. A. Moore. 2003. Characterization of grapefruit plants (*Citrus paradisi* Macf.) transformed with *citrus tristeza closterovirus* genes. *Plant Cell Reports* 21: 421-428.
- Febres, V. J., R. F. Lee, and G. A. Moore. 2008. Transgenic resistance to *citrus tristeza virus* in grapefruit. *Plant Cell Reports* 27: 93-104.
- Gutiérrez-E, M. A., D. Luth, and G. A. Moore. 1997. Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation in Citrus and production of sour orange (*Citrus aurantium* L.) plants expressing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Reports* 16: 745-753.
- Hilf, M. E., A. V. Karasev, H. R. Pappu, D. J. Gumpf, C. L. Niblett, and S. M. Garnsey. 1995. Characterization of citrus tristeza virus subgenomic RNAs in infected tissue. *Virology* 208: 576-582.
- Loeza-Kuk, E., E. C. Palacios-Torres, D. L. Ochoa-Martínez, G. Mora-Aguilera, M. A. Gutierrez-Espinoza, V. J. Febres, G. A. Moore, and R. Alvarez-Ramos. 2005. Molecular characterization of Citrus tristeza virus isolates from Veracruz and Tamaulipas States, Mexico. *In: Hilf, M. E., N. Durán-Vila, and M. A. Rocha-Peña. Proc. 16th Int. Org. Citrus Virol. pp: 407-411.*
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Olmos, A., E. Bertolini, M. Gil, and M. Cambra. 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *J. Virological Methods* 128: 154-155.
- Palacios Torres, E. C., M. A. Gutiérrez Espinosa, and G. A. Moore. 2001. Agrobacterium mediated transformation of 'Marsh' and 'Star Ruby' grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) and 'Valencia' sweet orange [*C. sinensis* (L.) Osbeck] with the coat protein gene of Citrus Tristeza Closterovirus. *In: Ledesma, N. and R. J. Campbell (eds). Proc. Interamerican Soc. Tropical Hort.* 44: 107-110.
- Pérez-Molphe-Balch, E., and N. Ochoa-Alejo. 1998. Regeneration of transgenic plants of Mexican lime from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed tissues. *Plant Cell Reports* 17: 591-596.
- Sambade, A., L. Rubio, S. M. Garnsey, N. Costa, G. W. Müller, M. Peyrou, J. Guerri, and P. Moreno. 2002. Comparison of viral RNA populations of pathogenically distinct isolates of citrus tristeza virus: application to monitoring cross-protection. *Plant Pathol.* 51: 257-263.
- Swillens, S., J. C. Goffard, Y. Maréchal, A. K. d'Exaerde, and H. Housni. 2004. Instant evaluation of the absolute initial number of cDNA copies from a single real-time PCR curve. *Nucleic Acids Res.* 32: 53-59.

- Tennant, P., G. Fermin, M. M. Fitch, R. M. Manshardt, S. L. Slightom, and D. Gonsalves. 2001. Papaya ringspot virus resistance of transgenic Rainbow and SunUp is affected by gene dosage, plant development, and coat protein homology. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 645-653.
- Wong, M. L., and F. J. Medrano. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39: 75-85.
- Yokomi, R. K., and DeBorde, R. L. 2005. Incidence, transmissibility, and genotype analysis of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from CTV eradication and noneradication districts in central California. *Plant Dis.* 89: 859-866.