

# ANALISIS DE LA SECUENCIA DE NUCLEOTIDOS DEL GEN DE LA CAPSIDE Y LA POLIMERASA ENTRE DIFERENTES AISLAMIENTOS DEL VIRUS MOTOSO DEL ENANISMO DE LA FRAMBUESA

## SEQUENCE ANALYSIS OF THE CAPSID AND POLIMERASE GENES OF DIFFERENT RASPBERRY BUSHY DWARF VIRUS (RBDV) SAMPLES

Angel J<sup>1</sup>., Mayo M<sup>2</sup>.

### RESUMEN

Este proyecto tuvo como objetivo determinar el grado de variabilidad existente al interior de las secuencias correspondientes al gen de la cápside y de la polimerasa entre cinco aislamientos de RBDV. Para este propósito, el DNA complementario (cDNA), correspondiente al gen de la cápside y de la polimerasa, fueron obtenidos por transcriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), a partir de RNA de plantas inoculadas con cada uno de los respectivos aislamientos. El cDNA correspondiente al gen de la cápside y de la polimerasa, obtenido de cada aislamiento de RBDV, mediante esta metodología se clonó en el plásmido pGEM-T para ser secuenciado posteriormente. Los resultados mostraron que tanto el gen de la cápside, como el de la polimerasa, variaron menos del 1% entre estos aislamientos. Por lo tanto, se puede esperar que una secuencia transgénica de RBDV (de la cápside o de la polimerasa) que proteja contra un aislamiento de RBDV, podría también proteger contra otras cepas de RBDV.

**Palabras claves:** Virus motoso, frambuesa, cápside, polimerasa.

### SUMMARY

This work was aimed to find sequence variability between capsid and polymerase gene sequences of five RBDV samples. Capsid and polymerase cDNAs were obtained by reverse transcription and PCR (RT-PCR) of RNA extracted from plants inoculated with each of the respective isolated samples. The amplified products were cloned in pGEM-T and sequenced. The results showed that the capsid and polymerase sequences varied less than 1% among the isolated samples. These data suggested that capsid and polymerase transgenic sequences that protect against a particular RBDV sample might protect against the others.

**Keywords:** Raspberry, dwarf virus, capsid, polymerase.

### INTRODUCCION

Aunque la secuencia de nucleótidos del genoma de la cepa R-15 ha sido establecida en su totalidad, el grado de homología del genoma de RBDV entre diferentes aislamientos del virus no ha sido estudiado ( Mayo *et al.*, 1991; Ziegler *et al.*, 1992). Tres razones en el presente trabajo, motivaron el estudio para establecer las diferencias entre las secuencias de nucleótidos del gen de la cápside y de la polimerasa, en diferentes aislamientos de RBDV. La primera razón consistió en

<sup>1</sup> Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), A.A. 7984 Santafé de Bogotá. B.Sc., M.Sc., Ph.D.

<sup>2</sup> Scottish Crop Research Institute, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, Scotland, UK. B.Sc., Ph.D., C.Biol., M.I Biol.

que el mejor criterio con el cual se puede establecer si dos aislamientos virales son idénticos o diferentes, se realiza determinando el porcentaje de identidad de la secuencia de bases de sus genes. La segunda consistió en medir el grado de protección que podría ser generado por un transgene originado de un aislamiento viral contra otros aislamientos de RBDV. La tercera razón fue investigar posibles diferencias del gen de la cápside y de la polimerasa entre las cepas Canby Severe y Canby Mild de RBDV y establecer si la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de estas dos proteínas, tenían alguna relación con los cambios de conducta drástica detectadas entre estas dos cepas de RBDV. Canby Severe, la cual produce drásticos efectos citopáticos en el huésped, emergió de un cultivo de RBDV de Canby Mild (que produce leve o ningún efecto citopático en el huésped), durante un subcultivo de esta cepa en *Nicotiana bethamiana* (A.T Jones comunicación personal).

La mayoría de los virus muestran una alta similitud con respecto al genoma de sus parentales, pero los nuevos descendientes pueden sufrir modificaciones en sus genomas dando lugar a nuevos aislamientos o cepas; estos cambios se dan como causa de pérdida de nucleótidos o errores durante la replicación del genoma viral. Las diferencias fenotípicas como consecuencia de estos cambios genómicos en los virus, usualmente son pequeñas, pero en algunos casos como en la cepa PM1 de Virus del Mosaico del Tabaco (TMV), pueden originar grandes variaciones que producen cápsides defectuosas o partículas virales incompletas (Powell *et al.*, 1990). En general, el gen de la polimerasa ha sido reportado como una secuencia genómica estable, encontrándose por ejemplo, similitudes entre la polimerasa de RNA dependiente de RNA viral putativa de todas las plantas y la mayoría de las polimerasas de virus de animales. (Halminton *et al.*, 1987).

Por otra parte, el gen correspondiente a la cápside viral, ha sido de particular importancia para la delineación de genomas de virus y cepas virales. Muchas de las propiedades biológicas de los virus, dependen de la cápside, por ejemplo, especificidad del vector, especificidad serológica, arquitectura del virus, movilidad electroforética de las proteínas virales, entre otras. Consecuentemente, la relación dentro de grupos virales, basadas sobre las propiedades biológicas, dependen largamente de la secuencia de nucleótidos de la cápside. (Matthews, 1991).

## MATERIALES Y METODOS

**Cepas virales:** Los aislamientos de RBDV de las cepas: D-200, Canby Mild y Canby Severe fueron

donados por el Doctor A.T. Jones del Scottish Crop Research Institute. Las cepas se mantuvieron en *Chenopodium quinoa* o *N. bethamiana* bajo condiciones de invernadero. La secuencia total de nucleótidos de la cepa R-15 ha sido previamente reportada (Murant *et al.*, 1986; Mayo *et al.*, 1991; Ziegler *et al.*, 1992). La secuencia de nucleótidos correspondiente al gen de la cápside de la cepa Madawasca de RBDV, se secuenció a partir de un plásmido con dicha secuencia, el cual fue donado por la Doctora A. Ziegler del Scottish Crop Research Institute.

**Extracción de DNA y RNA:** Se realizó la extracción de RNA total de plantas de *Chenopodium quinoa* infectadas con los diferentes aislamientos de RBDV usando el método descrito por Verwoerd *et al.* (1989).

**Secuenciación de genes de RBDV:** cDNA correspondiente a la secuencia de la cubierta proteica o de la polimerasa, se obtuvo por RT-PCR a partir del RNA de cada aislamiento de RBDV, utilizando los iniciadores apropiados. El producto de cada PCR se clonó en el vector pGEM-T (Laboratorios Promega). El plásmido recombinante con el gen problema se usó para transformar *E. coli* DH5a. Las colonias recombinantes con el gen de interés se seleccionaron por PCR usando los iniciadores apropiados. El DNA plasmídico con el gen de interés se usó para obtener iniciadores por el sistema de purificación de DNA plasmídico de QIAGEN (Laboratorios Promega). Un análisis final se realizó por PCR para garantizar la presencia y el tamaño correcto del gen en cuestión, el cual se ajustó a una concentración final de 0.2 mg /mL. El DNA correspondiente a cada gen se secuenció mediante el sistema de secuenciación automático utilizando el equipo ABI Prism Modelo 377 Versión 2.1.1.

**Análisis computarizado de datos:** Cada secuencia se analizó al menos dos veces en ambas direcciones. Una secuencia consenso se dedujo para cada gen usando los programas DBUTIL y DBAUTO (Staden, 1982). La secuencia de nucleótidos se comparó usando el programa CLUSTAL V (Higgins *et al.*, 1992). La secuencia de traducción de aminoácidos se dedujo usando el programa GGG TRANSLATE (Wisconsin Package, Anon, 1994). Estas secuencias de aminoácidos se compararon usando el programa PUBLISH (Devereux *et al.*, 1984).

## RESULTADOS

**Comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen de la cubierta proteica entre cinco aislamientos de RBDV:** Los resultados de la comparación entre la secuencia de nucleótidos del gen de la cápside entre estos aislamientos se



200 y Madawasca, por lo tanto, la cubierta proteica de estos dos aislamientos está altamente relacionada. En contraste, la mayoría de los cambios de aminoácidos encontrados en la cápside de los aislamientos Canby Severe y R-15 difirieron en sus grupos químicos.

```

.....10.....30.....50.....
r MSKKAVPPIVKAQYELYNRKLNRRAIKVSGSQKLLDASFVGFSESSNPETGKPHADMSMSA
s .....N.....N.....G.....A.....
d .....R.....
c -----
m -----

.....70.....90.....110.....
r KVKRVNTWLKNFDRYWDNQFASKPIPRPAKQVLKGSSSKSQORDEGEVVFTRKDSQKSV
s ..S.....V.....
d .....V.....
c .....V.....
m .....V.....

.....130.....150.....170.....
r RTVSYVWCTPEKSMKPLKYKEDENVVEVTFNDLAAQKAGDKLVSIILLEINVVGAVDDKG
s .....T.....
d .....T.....G.....
c .....T.....
m .....T.....

.....190.....210.....230.....
r RVAVLEKDAAVTVDYLLGSPYEAINLVSGLNKINFRSMTDVVDSIPSLNERNKVCVFQND
s .....
d .....
c .....X.....
m .....

.....250.....270.....
r DSSSFYIRKWANFLQEVSAVLPVGTGKSSTIVLT
s .....
d .....
c .....XX.....XX.....X.....
m -----
    
```

**Figura 1. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la cápside entre cinco aislamientos de RBDV. Abreviaciones: r:R15; s: Canby Severe; d: D-200; c: Canby Mild y m: Madawaska. (X) y (-) representan aminoácidos desconocidos, los cuales no pudieron ser identificados sobre el producto de la secuenciación .**

**Comparación de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del gen de la polimerasa entre tres aislamientos de RBDV:** La Tabla 3 muestra todos los cambios de nucleótidos de la polimerasa detectados entre los aislamientos R-15, D-200 y Canby Severe. Este análisis muestra que no hubo diferencias significativas entre estas secuencias. La mayoría de los cambios de nucleótidos encontrados en el gen de la polimerasa entre estos aislamientos no tuvieron efecto en el código genético de este gen. La comparación de la secuencia de nucleótidos del gen de la polimerasa del aislamiento R-15 con los aislamientos D-200 y Canby Severe resultó en 46 y 42 cambios respectivamente, 37/46 cambios en Canby Severe y 33/42 en D-200 no tuvieron efecto en el código genético de las dos secuencias. Cuando esta secuencia se comparó entre los aislamientos Canby Severe y D-200, se identificaron 46 cambios de nucleótidos de los cuales 32 no tuvieron efecto de código. Este análisis muestra que la secuencia de nucleótidos correspondiente a este gen es una

secuencia relativamente conservada entre cepas de RBDV (Tabla 3).

**Tabla 3. Número de cambios de la secuencia de nucleótidos de la polimerasa entre tres aislamientos de RBDV.**

	R15	Canby Severe	D-200
R-15	-	47\10*	42\9
Canby Severe		-	47\15
D-200			-

\*Número total de cambios de nucleótidos / número de cambios que alteraron el código.

**Tabla 4. Comparación de la secuencia de aminoácidos de la polimerasa entre tres aislamientos de RBDV.**

	D-200 Aislamiento		Canby Severe Aislamiento			
R15 Aislamiento	I	s	V*	F*	d	S
D-200 Aislamiento	F*	d	S	S	d	F*
	K	d	A*	D	s	E*
	P	d	S*	V*	s	I
	V*	s	I			
	S	d	Y*			
D-200 Aislamiento				D-200	Canby Severe	
				V*	s	I
				A*	d	K
				S*	d	P
				S	d	F*
				D	s	E*
				Y*	d	S

\* Aminoácido encontrado únicamente en este aislamiento en esta posición. (d) grupo químico diferente y (s) grupo químico similar.

```

R15      1330      1350
D200    FDLENLANKAVERFFDFIDMEKFSKLP TGVLGSSAEQIQTYQNK TGKNTVDPVCVALSP
SEV

R15      1370      1390      1410
D200    IQKYKHMIRKRDVFNLTGDAQSEYTKAATIT YHQPEITQVATAIFGQFKTRLLACRNKFL
SEV      V

R15      1430      1450      1470
D200    NIPLEHDNDLSGYLTKYHLGSENNFTFEIDF SKFKDSQGEIHQLIQDLLIKFGC
SEV      S      R

R15      1530      1550      1570
D200    LVTAAMLAFVISDPDREKIRYMLVGGDDSLCSYGP IQVPLEPLGDFNMSCKLVQPACP
SEV      S      VF

R15      1590      1610      1630
D200    YFASRYLIRGDEILCVDPDYKLLVKGKRVDPDNQASLCEIR TGLADSAKYIFDDIVKQ
SEV      E      I      I

R15      1650      1670      1690
D200    KLAILVQVRYNKAAPSLYDALCTVHWALSSNTN FSKFYTVTNTSNEVRRNRGKVKIT
SEV
    
```

**Figura 2. Comparación de las secuencias de aminoácidos de la polimerasa entre tres aislamientos de RBDV. Abreviaciones: SEV: Canby Severe**

El análisis de aminoácidos de este gen, mostró que la estructura química de ésta proteína es estable cuando se comparó entre tres aislamientos (Figura 2 y Tabla 4). La secuencia del gen de la polimerasa ubicada entre los aminoácidos 1470 y 1530 no aparece puesto que no pudo ser secuenciada por la metodología seguida, ya que la longitud del gen es relativamente extensa.

## DISCUSION

**Comparación de la secuencia de aminoácidos del gen de la cubierta proteica y la polimerasa entre aislamientos de RBDV:** La cepa Canby Severe tuvo el más alto número de diferencias de aminoácidos en la cubierta proteica, cuando se comparó con la cubierta proteica de otros aislamientos. Un resultado interesante de este análisis, se debe a que la secuencia de la cubierta proteica de Canby Severe y Canby Mild, difirieron sólo en cuatro aminoácidos; todos los cuatro cambios fueron mutaciones exclusivas de Canby Severe. Por lo tanto, existe la posibilidad de que algunos de estos cambios estén involucrados en la conducta distintiva de Canby Severe, desde que esta cepa se aisló de un cultivo de Canby Mild. Estas cuatro diferencias de aminoácidos poseen además diferentes propiedades químicas y probablemente alteran la naturaleza de la cubierta proteica y consecuentemente, la conducta del virus. Experimentos de mutagénesis para generar cambios en estos cuatro aminoácidos de la cubierta proteica de Canby Severe podrían determinar si algunos de estos cambios de aminoácidos están involucrados en la conducta de severidad viral.

Otra observación interesante consiste en que la cápside de la cepa Canby Mild y Madawasca, no mostraron diferencias en la secuencia de aminoácidos de su cubierta proteica (aunque la secuencia de nucleótidos de este gen difirió en cinco de ellos). Por lo tanto, estas cepas pueden ser consideradas aislamientos de RBDV estrechamente relacionados. En contraste, la secuencia de aminoácidos de la cubierta proteica de los aislamientos D-200, R-15 y Canby Severe fueron las secuencias que más difirieron entre los cinco aislamientos analizados. Aunque, no se han encontrado diferencias serológicas por ELISA entre aislamientos de RBDV, se esperaba que la cubierta proteica de los aislamientos R-15 y D-200 presentara mayor similitud, ya que ambas cepas se aislaron en el Reino Unido (A.T. Jones, comunicación personal). Sin embargo, los resultados indicaron que la cápside de R-15 es muy similar a la cápside de Canby Mild y Madawasca. De otra parte, el análisis de la secuencia de aminoácidos de la polimerasa entre los tres aislamientos, indicó que la estructura química de esta proteína sigue siendo bastante estable, mostrando

sólo ligeros cambios que no afectan la estructura química de la enzima.

Estos resultados pueden ser explotados de dos maneras: (i) hasta la fecha, las técnicas serológicas son las pruebas más populares en todo el mundo entre muchas metodologías usadas para la identificación y clasificación de virus de plantas, debido a que ellas, son simples, reproducibles, eficientes y relativamente económicas en términos de reactivos y espacio. Virus de varios géneros, por ejemplo, tobamoviruses (Gibbs, 1977) y tymoviruses (Koenig and Lesemann, 1977), se pueden caracterizar con confianza con base en sus propiedades serológicas, aunque es muy improbable que técnicas serológicas se puedan usar para distinguir aislamientos de RBDV debido a la similitud de la cubierta proteica entre aislamientos. Sin embargo, es necesario realizar mapeos de epítotes, debido a que cambios en la secuencias de aminoácidos pueden afectar dramáticamente la estructura tridimensional de una proteína. De acuerdo con estos resultados, se podría explotar la detección de algunas regiones variables de la secuencia de nucleótidos de la cápside entre aislamientos de RBDV, para diferenciar aislamientos y diseñar pruebas de diagnóstico mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La preparación de iniciadores específicos correspondientes a la secuencia de la cápside de un aislamiento particular de RBDV, los cuales podrían no reconocer la secuencia de la cápside de otros aislamientos del virus, podría resultar en una poderosa técnica de diagnóstico para distinguir diferentes aislamientos virales. (ii) Debido a la alta conservación de las secuencias de los genes de la cápside y de la polimerasa de RBDV (esta variabilidad representa menos del 1% entre las secuencias de estos genes), es posible esperar que si la secuencia del gen de la cápside de un aislamiento se introduce en el genoma de una planta y se induce resistencia para este aislamiento, este transgen podría ser protectoro contra la infección de otros aislamientos de RBDV.

En síntesis, los resultados presentados en este trabajo ilustran una variedad de caminos en los cuales la biotecnología, basándose en el conocimiento de la biología molecular de los virus, puede ser explotada para proveer nuevas soluciones a problemas de enfermedades causadas por virus.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por Colciencias, la Secretaría de Agricultura del Reino Unido (The Scottish Office Agriculture, Environment and Fisheries Department) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

## BIBLIOGRAFIA

**Anon.** 1994. Wisconsin Package Program. Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711.

**Devereux, J., Haeberli, P., and Smithies, O.** 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 12, 387-395.

**Gibbs, A.J.** 1977. Tobamovirus group. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 184.

**Hamilton, W.D.O., Boccarda, M., Robinson, D.J., and Baulcombe, D.C.** 1987. The complete nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. J. Gen. Virol. 68, 2563, 2575.

**Higgins, D.G., Blebs, A.J., and Fuchs, R.** 1992. CLUSTALV: Improved software, for multiple sequence alignment. CABIOS 8, 189-191.

**Jones, A.T., Murant, A.F., Jennings, D.L., and Wood, G.A.** 1982. Association of raspberry bushy dwarf virus with raspberry yellows disease: reaction of Rubus species and cultivars, and the inheritance of resistance. Ann. Appl. Biol. 100, 135, 147.

**Koenig, R., and Lesemann, D.E.** 1979. Tymovirus group. C.M.I./A.A.B. Descriptions of Plant Viruses. No. 214.

**Matthews, R.E.F.** 1991. Plant Virology. Third Edition. Harcourt Brace

Jovanovich, Publishers. Academic Press, Inc., New York.

**Mayo, M.A., Jolly, C.A., Murant, A.F., and Raschke, J.H.** 1991. Nucleotide sequence of raspberry bushy dwarf virus RNA-3. J. Gen. Virol. 72, 469-472.

**Murant, A.F., Mayo, M.A., and Raschke, J.H.** 1986. Some biochemical properties of raspberry bushy dwarf virus. Acta Hort. 186, 23-30.

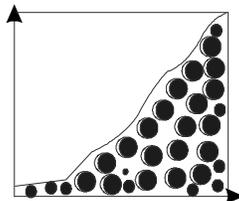
**Powell, P.A., Sanders, P.R., Turner, N., Fraley, R.T., and Beachy, R.N.** 1990. Protection against tobacco mosaic virus infection in transgenic plants requires accumulation of coat protein rather than coat protein RNA sequences. Virology 175, 124-130.

**Staden, R.** 1982. An interactive graphics program for comparing and aligning, nucleic acid and amino acid sequences. Nucleic Acids Res. 10, 2951-2961.

**Verwoerd, C., Dekker, B.M.M., and Hoekema, A.** 1989. A small-scale procedure, for the rapid isolation of plant RNAs. Nucleic Acids Res. 17, 2362.

**Ziegler, A., Natsuaki, T., Mayo, M.A., Jolly, C.A., and Murant, A.F.** 1992. The nucleotide sequence of RNA-1 of raspberry bushy dwarf virus. J Gen. Virol. 73,3213-3218.

## PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS Y MEDIOAMBIENTALES



### DIVISION BIOTECNOLÓGICA

- CONSULTORIA PARA EL DISEÑO DE PROCESOS DE FERMENTACION Y CULTIVO CELULAR
- ESTUDIO EN PLANTA PILOTO DE PROCESOS DE FERMENTACION Y CULTIVO CELULAR
- DISEÑO Y CONSTRUCCION DE FERMENTADORES Y COLUMNAS PARA CELULAS INMOVILIZADAS
- CONSULTORIA EN PRODUCCION DE VACUNAS, BIOINSECTICIDAS Y BIOFERTILIZANTES

### DIVISION MEDIOAMBIENTAL

- CONSULTORIA AMBIENTAL
- AUDITORIAS AMBIENTALES
- SISTEMAS DE GESTION AMBIENTAL
- EVALUACION DEL IMPACTO AMBIENTAL
- ASESORIA EN DISEÑO DE PRODUCTOS AMBIENTALES RESPONSABLES
- ASESORIA Y TRAMITE DE LICENCIAS AMBIENTALES
- EDUCACION AMBIENTAL

*Carrera 99 No. 130B - 15 - Teléfono: 684 49 88 - Santafé de Bogotá, D.C.*