UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS PSOROSIS DE CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR TIEMPO REAL Y SU EVALUACIÓN EN MUESTRAS DE CAMPO"

POR

MC GABRIELA BARRAGÁN VALENCIA

Como requisito parcial para obtener el grado en DOCTORA EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

JUNIO DEL 2007

GBV

"Implementación de un método cuantitativo para la detección del virus porcino de clínica mediante RT-PCR tiempo real y su evaluación en muestras de campo"

TD
Z5320
FCB
2007
.B37

2007

1020160580

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS PSOROSIS DE CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR TIEMPO REAL Y SU EVALUACIÓN EN MUESTRAS DE CAMPO"

POR

MC GABRIELA BARRAGÁN VALENCIA

Como requisito parcial para obtener el grado en DOCTORA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

JUNIO DEL 2007

1470045

FONDO
TESIS
0209.8

TD
Z5320
FCB
2007
.B37

15-VIII-08
Mario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS PSOROSIS DE CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR TIEMPO REAL Y SU EVALUACIÓN EN MUESTRAS DE CAMPO"

Por

MC GABRIELA BARRAGÁN VALENCIA

Como requisito parcial para obtener el grado en DOCTORA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

Junio del 2007

APROBACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL POR COMITÉ DE TESIS

"IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO CUANTITATIVO PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS PSOROSIS DE CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR TIEMPO REAL Y SU EVALUACIÓN EN MUESTRAS DE CAMPO"

COMITÉ DE TESIS

Dra. Isela Quintero Zapata (Director de tesis)

Dr. Carlos F. Sandoval Coronado (Secretario)

Dra. Lilia H. Morales Ramos (Vocal 1)

Dra. Katiushka Arévalo Niño (Vocal 2)

Dra. Irma O. Martínez Vázquez (Vocal 3)

Dr. Alberto Morales Loredo (Director externo)

Dra. Ma. Genoveva Álvarez Ojeda (Director externo)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, a los miembros de mi comité de tesis Dra. Isela Quintero Zapata, Dr. Carlos F. Sandoval Coronado, Dra Lilia H. Morales Ramos, Dra. Katiushka Arévalo Niño y Dra. Irma O. Martínez Vázquez, a maestros y compañeros.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agropecuarias y Pecuarias, al director externo de la tesis Dr. Alberto Morales Loredo y al Laboratorio Central Regional del Comité para el Fomento y Protección Pecuaria del Estado de Nuevo León, por permitirme el espacio físico y temático para el desarrollo de la tesis, así como por las facilidades brindadas para el trabajo experimental de la misma.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada.

A mi familia, a Dios.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	16
ABSTRACT	17
2. INTRODUCCIÓN	18
3. OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares	20
4. ANTECEDENTES	21
4.1 Definición de la enfermedad	21
4.2 Agente causal	22
4.3 Genoma del CPsV	24
4.4 Taxonomía	27
4.5 Distribución del CPsV	27
4.6 Métodos de detección	28
4.7 Detección por RT-PCR	29
4.8 Métodos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR	29
4.9 Protocolos de RT-PCR para la detección del CPsV	30
4.10 Teoría sobre RT-PCR tiempo real	33
5. MATERIALES Y MÉTODO	37
5.1 Material biológico	37
5.2 Evaluación de métodos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR	38
5.2.1 Extracciones de RNA con proteinasa K	38

5.2.2 Extracción de ácidos nucleicos mediante cromatografía en columnas de celulosa (extracción con celulosa) 38
5.2.3 Extracción con amortiguador GPS más PVP, macerando el tejido con nitrógeno líquido (extracción con GPS más PVP c/N_2) 39
5.2.4 Extracción con amortiguador GPS más PVP, macerando el tejido con la solución amortiguadora (extracción con GPS más PVP s/N_2) 39
5.2.5 Extracciones de RNA con TRIzol 39
5.2.6 Evaluación de la calidad de los extractos de RNA 40
5.2.7 RT-PCR 40
5.2.7.1 Protocolo de Barthe, *et al.*, 1998 40
5.2.7.2 Protocolo de Legarreta *et al.*, 2000 40
5.3 Implementación del protocolo de RT-PCR tiempo real para la detección del CPsV 41
5.3.1 Obtención de estándares de concentración de DNA y RNA del CPsV como controles de cuantificación para RT-PCR tiempo real 41
5.3.1.1 Extracción de ácidos nucleicos 41
5.3.1.2 Amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 600 pb que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV 42
5.3.1.3 Purificación del fragmento amplificado y obtención de un estándar de concentración de DNA 42
5.3.1.4 Clonación del fragmento de DNA amplificado por PCR 43
5.3.1.5 Transformación de células competentes 43
5.3.1.6 Selección de células transformadas 43
5.3.1.7 Obtención de estándar de concentración de RNA 46
5.3.2 Diseño de iniciadores y sonda Taqman para RT-PCR tiempo real. 48
5.3.3 Evaluación de los diseños de iniciadores y de la sonda 49
5.3.3.1 Evaluación del diseño con base en la secuencia 49

reportada en el banco de genes AFO36338
5.3.3.2 Evaluación de los iniciadores y de la sonda para tiempo real diseñados con base en la secuencia obtenida a partir de una muestra de campo 50
5.3.4 Curva estándar de RT-PCR tiempo real 51
5.4 Detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo 51

6. RESULTADOS 52
6.1 Evaluación de la calidad de los extractos de RNA 52
6.2 Resultados de RT-PCR protocolo de Barthe, *et al.*, 1998 53
6.3 Resultados de RT-PCR protocolo de Legarreta, *et al.*, 2000 54
6.4 Obtención de un control positivo para RT-PCR tiempo real 55
6.5 Secuencias de los fragmentos de 559 bases que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV 57
6.6 Evaluación de la sonda Taqman y los iniciadores para RT-PCR tiempo real diseñados con base en la secuencia AFO36338 reportada en el banco de genes 58
6.7 Evaluación de la sonda Taqman y los iniciadores para RT-PCR tiempo real diseñados con base a la secuencia obtenida de 559 bases del gen de la proteína de la cápside del CPsV 59
6.8 Curva estándar para RT-PCR tiempo real 61
6.9 Detección cuantitativa del CPsV mediante RT-PCR tiempo real en muestras de campo 64
7. DISCUSIÓN 66
7.1 Evaluación de métodos de extracción para la detección del CPsV por RT-PCR 66
7.2 Implementación de un protocolo de RT-PCR tiempo real 68
8. CONCLUSIONES 74
9. PERSPECTIVAS 76
10. LITERATURA CITADA 77
11. APÉNDICES 89

APÉNDICE A Secuencia del vector TOPO recombinante 89

APÉNDICE B Secuencia AFO36338 91

APÉNDICE C Selección de sonda Taqman e iniciadores por medio del programa Primers Express™ 92

APÉNDICE D Similaridad de secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias obtenidas de un fragmento de 559 bases del gen de la proteína de la cápside del CPsV 93

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	No. de acceso de secuencias reportadas para aislamientos del CPsV	25
II	Secuencias de iniciadores diseñados para la detección del CPsV	32
III	Secuencias de iniciadores y sonda Taqman obtenidos a partir de la secuencia AFO36338	48
IV	Secuencias de iniciadores y sonda Taqman seleccionados para efectuar RT-PCR tiempo real con base en la secuencia obtenida de un fragmento de 559 bases que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV	49
V	Combinaciones de concentraciones de iniciadores y sonda Taqman evaluadas en PCR tiempo real	50
VI	Resultados de la evaluación de los extractos por medio de espectofotometría	52
VII	Resultados obtenidos en la detección del CPsV por RT-PCR	54
VIII	Secuencias de los fragmentos de 559 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV	58
IX	Valores de C_T obtenidos con una misma concentración de DNA y combinaciones de concentraciones diferentes de sonda Taqman e iniciadores	60
X	Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de DNA	61
XI	Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de RNA	63
XII	Valores de C_T obtenidos en cada repetición de detección cuantitativa del CPsV	64

XIII	No. de copias del CPsV detectadas en 9 μL de RNA obtenidos de muestras de tejido infectado	65
XIV	Valores de C_T obtenidos para árboles sin sintomas	65
XV	Comparación de la secuencia de 70 bases de la muestra de campo que se pretendía amplificar, con su correspondiente en la secuencia AFO36338	69
XVI	Similaridad de las secuencias obtenidas de los fragmentos de 559 pb con otras reportadas en el banco de genes	70
XVII	Mezcla de reacción para transcripción *in vitro*	90
XVIII	Similaridad de la secuencia de 79 bases que se amplifica en RT-PCR tiempo real, con otras secuencias reportadas en el banco de genes	93

LISTA DE FIGURAS

Figura **Página.**

1. Síntomas inducidos por el CPsV. 23
2. Esquema del genoma del CPsV. 26
3. Esquemas de los compuestos químicos fluorescentes para PCR tiempo real 34
4. Síntomas en arboles afectados por el CPsV 37
5. Esquema de la estrategia de purificación de los fragmentos de 600 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV (QIAGEN, Inc.) 44
6. Esquema de la estrategia de clonación del fragmento de 600 pb del gen de la proteína de la cápside del CPsV 45
7. Esquema de la estrategia de transcripción *in vitro* de un fragmento híbrido de 797 rNTP's 47
8. Electroforesis en gel de agarosa de extractos de RNA 53
9. Electroforesis de productos de RT-PCR (protocolo de Legarreta, *et al.*, 2000) 55
10. Electroforesis del estándar de concentración del fragmento de 600 pb de DNA del CPsV 56
11. Electroforesis de DNA plásmido 56
12. Electroforesis de DNA plásmido y del RNA transcrito *in vitro* 57
13. Gráfico de la evaluación de la sonda y los iniciadores a concentraciones diferentes 59
14. Curva estándar de PCR tiempo real que se obtuvo con concentraciones diferentes de DNA 62
15. Curva estándar de RT-PCR tiempo real que se obtuvo con 63

concentraciones diferentes de RNA.

16. Secuencia del vector TOPO PCR®4 más la secuencia del fragmento de 600 bases clonado. 89

18. Simulación de la digestión del plásmido con la enzima *Pvu* II, con el programa NEB Cutter V2.0 90

19. Secuencia reportada por Barthe, *et al.*, 1998 (no. de acceso a Gen Bank AFO36338). 91

20. Resultado del análisis de la secuencia de 559 bases por medio del programa Primers express™ para la selección de un conjunto de primers y sonda para RT-PCR tiempo real 92

NOMENCLATURA

%	Porciento, porcentaje
°C	Grados celsium o centigrados
% p/v	Relación de porcentajes peso/volumen
[DNA]	Cantidad de DNA
µg	Microgramos
µl	Microlitro
µM	Micromolar
5X	Concentración 5 veces la concentración que se emplea en la preparación de un reactivo
$A_{260nm/280nm}$	Relación de absorbancias a 260 y 280 nm
Control -	Control negativo
CPsV	Virus psorosis de cítricos
CRSV	Virus ringspot de cítricos
C_T	Ciclo umbral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP´s	Desoxinucleotidos
DTT	Ditiotreitiol
g	Gramo
GPS	Amortiguador de glicina y fosfatos
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de los Virus
IOCV	Organización Internacional de Virologos de Cítricos
LB	Luria Bertani
M	Concentración Molar
min	Minuto
ml	Mililitro

mM	Concentración milimolar
NCBI	Siglas en ingles de Centro Nacional para Información de Biotecnología
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
No.	Número
ORF	*Open reading frame*
pb	Pares de bases
PC	Proteína de cápside
PCR	Siglas en ingles de Reacción en Cadena de la Polimerasa
PS	Psorosis Sonora
PVP	Polivinilpirrolidona
r^2	Coeficiente de correlación
RNA	Ácido ribonucleico
rNTP's	Ribonucleótidos
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Siglas en ingles de Transcripción inversa-Reacción en cadena de la polimerasa
s	Segundos
SAGARPA	Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SDS	Sulfato-dodecil de sodio
SEVAG	Solución de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v
ssRNA (-)	RNA de cadena sencilla de polaridad negativa
TACM	Amortiguador 0.5 M de Tris-HCl, pH 8, 0.1 % de ácido ascórbico, 0.1 % de císteina y 0.5% de β mercaptoetanol
TAE	Amortiguador de trizma base-EDTA
Tali	Temperatura de alinamiento
TE	Amortiguador trizma base-EDTA
Tm	Temperatura de desnaturalización
U	Unidades

RESUMEN

La psorosis es una patología que afecta arboles de cítricos, su agente causal es el virus psorosis de cítricos (CPsV) que provoca descortezamiento en tronco y ramas, manchas en forma de anillos en hojas y frutos. La detección del virus se realiza por medio de plantas indicadoras, serología y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés RT-PCR). La RT-PCR se ha utilizado hasta el momento para verificar la presencia o ausencia del virus. La metodología de RT-PCR tiempo real permite determinar carga viral, y representa una herramienta valiosa para el estudio de la psorosis. El objetivo general de este trabajo fue implementar un método cuantitativo en la detección del CPsV. Se evaluaron cinco métodos de extracción de RNA, a partir de hojas de diez arboles de naranja Mars afectados por psorosis. Se evaluó la calidad de los extractos de RNA por espectofotometría y por visualización en geles de agarosa. Se realizaron ensayos de RT-PCR convencional para detectar el CPsV, en los cuales solamente se obtuvieron resultados positivos de la detección del virus con RNA obtenido con el método que incluyó amortiguador de glicina y fostatos (GPS) más polivinilpirrolidona (PVP) así como con el que se utilizó TRIzol. Se obtuvieron estándares de concentración de RNA y DNA del CPsV, se implementó un protocolo de RT-PCR tiempo real y mediante éste se cuantificó carga viral en muestras de tejido infectado. Se obtuvo un 100% de confiabilidad en la detección del CPsV por RT-PCR convencional y tiempo real en plantas de invernadero, en muestras de campo se obtuvo un 40% de resultados positivos del CPsV en el total de muestras evaluadas.

ABSTRACT

Psorosis is a pathology of citrus trees, its causal agent is the citrus psorosis virus (CPsV). That virus induce bark scaling in branches and trunks, ringspoots in leaves and fruits. Virus detection is developed by seedling indexing, serology and reverse transcription- polimerase chain reaction (RT-PCR). RT-PCR has been used to verify the abseces or presence of the virus. Real time PCR has brought a quantitation of target nucleic acids and viral load and that is a valuable tool in order to study psorosis. The main propourse of this research was developed a quantitative method for detection CPsV. Five procedures of extraction RNA were evaluated on leaves of ten orange trees which are infected by psorosis. RNA extract quality was evaluated by spectophotometric and by observations on agarose gels. RT-PCRs assays were developed to detect CPsV. Positive results only were obtained with RNA obtained with TRIzol and with glycine phosphates buffer more polyvinilpirrolidone. Concentration standar CPsV RNA and DNA were obtained, real time RT-PCR was developed and load viral was quantified on samples of infected leaves. One hundread percent of confidence was ensured in the detection of CPsV by traditional and real time RT-PCR on greenhouse plants, whereas forty percent was obtained in the CPsV detection with truck farm samples.

INTRODUCCIÓN

La psorosis es una patología que afecta arboles de cítricos, ocasiona descortezamiento en tronco y ramas principales, manchas en formas de anillos en hojas y frutos, es una enfermedad de avance lento los experimentos en arboles en campo implican hasta diez años desde la inoculación del virus hasta la observación de síntomas (Roistacher, 1993). El agente causal de esta enfermedad es el virus psorosis de cítricos (CPsV) que es un partícula de RNA de cadena simple de polaridad negativa, su genoma se ha secuenciado para aislamientos obtenidos en diferentes partes del mundo como Florida, EU, Argentina, España, Italia, etc (Milne, *et al.*, 2003). Esta patología se encuentra diseminada en todo el mundo, y resulta de mayor interés en las regiones productoras de cítricos. La manera más segura de erradicar el virus es por medio de programas de certificación de material de propagación (Roistacher, 1993), en México la norma NOM-079-FITO-2002 SAGARPA establece la obligatoriedad de certificar material de propagación. Sin embargo, hay reportes de la presencia de psorosis en diferentes regiones productoras de cítricos, probablemente debido a la falta conocimiento de la enfermedad y a la falta de implementación de protocolos para la detección del virus. Los síntomas que provoca el CPsV se pueden confundir con daños provocados por otros patógenos, por factores climáticos o por una fertilización mala. De aquí la necesidad de evaluar e implementar metodologías para la detección del CPsV, así como probar por métodos moleculares la presencia del CPsV en regiones citrícolas de nuestro país. Los métodos de detección del CPsV con los que se cuenta son: por medio de plantas indicadoras, serología y RT-PCR. La RT-PCR se ha utilizado para detectar la presencia o ausencia del virus. La metodología de RT-PCR tiempo real permite cuantificar carga viral y se basa en la unión de compuestos químicos fluorescentes a las copias de DNA que se generan durante los ciclos de la PCR; la fluorescencia generada es proporcional a la cantidad inicial de RNA o DNA en la muestra, por lo que previo a un ejercicio de calibración es posible conocer la cantidad de RNA de interés en muestras problemas (Mackay, *et al.*, 2002).

La detección por RT-PCR en tiempo real se ha utilizado en el estudio de enfermedades provocadas por virus en humanos, plantas y animales; la carga viral se ha correlacionado con el grado de infección, activación y desarrollo de enfermedades por lo que se considera que podría ser una herramienta en el estudio de la psorosis.

Para el caso del virus psorosis de cítricos no hay protocolos implementados, dado que se le considera una metodología útil tanto en la detección del CPsV como en el estudio de la patología, el objetivo general de esta tesis es implementar un método cuantitativo en la detección del virus mediante RT-PCR tiempo real.

OBJETIVO GENERAL

Implementar un protocolo cuantitativo para la detección del virus psorosis de cítricos (CPsV) mediante RT-PCR tiempo real y su evaluación en muestras de campo.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar cinco procedimientos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR convencional en muestras de campo

Obtener un control positivo para la cuantificación absoluta para RT-PCR en tiempo real en la detección del CPsV

Obtener el diseño de una sonda Taqman e iniciadores para RT-PCR en tiempo real

Implementar un protocolo cuantitativo de RT-PCR en tiempo real para la detección del CPsV

Evaluar el protocolo implementado de RT-PCR en tiempo real en muestras de campo

ANTECEDENTES

4.1 Definición de la enfermedad

La psorosis es una patología que afecta arboles de cítricos, conduce a un deterioro de los arboles y pérdida de productividad. Las plantas que se reportan como susceptibles a ser afectadas por esta enfermedad son arboles de naranja, mandarina y pomelo principalmente, a diferencia de éstas se menciona que en arboles de limón es raro observar esta patología. En las plantas afectadas por la psorosis se pueden observar la mayoría o todos los siguientes síntomas: descortezamiento en ramas y troncos; manchas en forma de anillos en hojas; surcos y anillos semi-circulares descoloridos en los frutos; manchas en la madera del cambium, reacciones de shock en plantas indicadoras y en plantas que crecen en condiciones de invernadero tales como naranja dulce, mandarina, cidra o limón (Roistacher, 1993) ver figura 1.

La psorosis fue descrita originalmente y nominada como tal en 1896 por Swingle y Webber en Florida, y se asoció con el descortezamiento en troncos y ramas, en 1908 se identificaron arboles afectados en California por Smith y Butler (citados en Levy y Gumpf, 1991). Inicialmente se pensaba que la psorosis era ocasionada por una bacteria u hongo debido a que las lesiones eran definidas y localizadas. Sin embargo en intentos de encontrar al microorganismo responsable, se aislaron especies desde la superficie externa de las lesiones pero las inoculaciones fallaron en reproducir la enfermedad. La observación de los síntomas en hojas y frutos así como la evidencia que la enfermedad se trasmite por injerto y por lo tanto que es una enfermedad sistémica, condujo a la teoría que la psorosis es provocada por un virus (Fawcett, 1933). Aún sin conocer a ciencia cierta el agente causal de la psorosis, desde su descubrimiento se reportó su presencia en diferentes partes del mundo y naturalmente su estudio fue de mayor interés en las regiones productoras de cítricos como Argentina, Florida, California, Brasil,

España y recientemente en Italia. En diversos estudios se considera a esta patología como un factor limitante para la producción de cítricos. Una característica de esta enfermedad es que es de avance lento, lo que de alguna manera explica que los experimentos iniciales realizados en campo tomaran hasta una década para observar resultados (Fawcett, 1933) y que su caracterización se haya dado poco a poco, de hecho desde que se descubrió hasta los años 80's la psorosis se relacionó con otras patologías como goma cóncava, impetriatura, cristacortis, etc., debido a que compartían síntomas similares y que en ocasiones había arboles afectados por patologías diferentes (Fawcett y Bitancourt, 1943; Wallace, 1945; Desjardis y Wallace, 1962; Broadbent, 1972; Navarro, *et al.*, 1980; Garnsney y Timmer, 1988; Derrick and Timmer, 2000). Los experimentos que permitieron estudiarla como una patología independiente a las otras, fueron los experimentos de inoculación de plantas de invernadero y de protección cruzada. En 1938 Fawcett y Klotz (citados en Roistacher, 1993) propusieron dos tipos de psorosis, la psorosis de tipo A y la psorosis de tipo B *"ambas tienen síntomas similares de lesiones en la corteza pero en el tipo B, las hojas maduras más viejas muestran manchas cloróticas en forma de anillos – los síntomas en frutas son raros en el tipo A mientras que para el caso del tipo B, se observan comúnmente surcos o anillos circulares o semicirculares largos y descoloridos"*.

Roistacher en 1965 (citado en Roistacher, 1993) reportó que plantas inoculadas con el patógeno de goma cóncava no protegen contra un desafío de psorosis B, por lo tanto es una patología diferente. Al contrario de esta patología, las plantas inoculadas con psorosis del tipo A y ringspot (que no se había considerado relacionada a la psorosis), sí protegían contra el desafío de psorosis B, por lo que se consideraron como pertenecientes al grupo de la psorosis.

4.2 Agente causal

En 1988, Derrick *et al.*, reportaron el aislamiento y caracterización parcial de un virus obtenido de extractos de plantas de *Chenopodium quinoa* inoculadas con el supuesto virus ringspots de cítricos (siglas en inglés CRSV). Cuando sometieron a

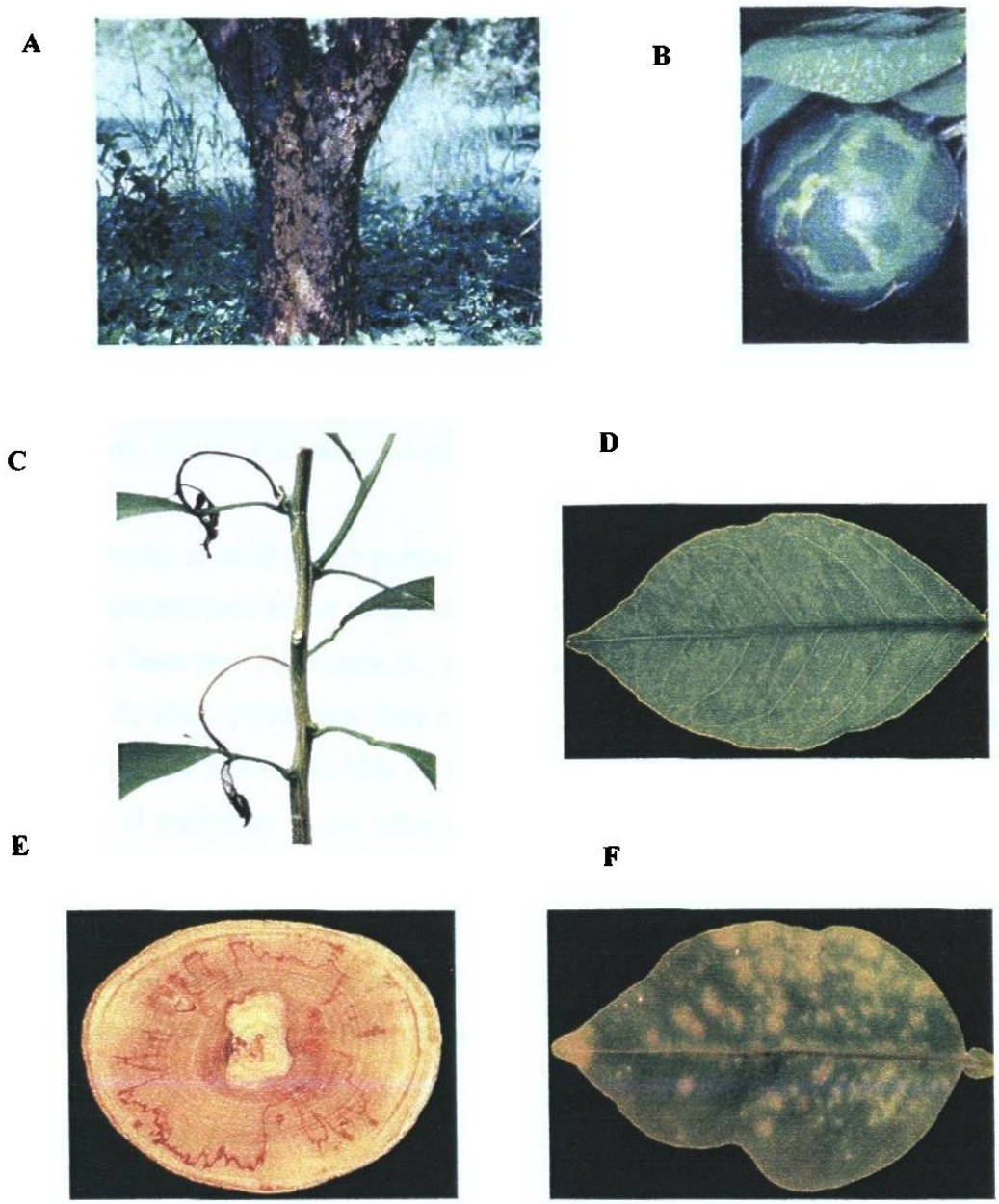


Figura 1. Síntomas inducidos por el CPsV. A, descortezamiento en tronco de un árbol de naranja. B, surcos descoloridos en frutos. C, síntomas de shock en plantas de invernadero después de la inoculación con yemas infectadas. D, manchas cloróticas sobre hojas jóvenes de arboles de naranja. E, Tinción en la madera de los arboles de naranja. F, síntomas de psorosis B en hojas viejas de arboles de naranja.

gradientes de densidad los extractos, encontraron que se requerían dos fracciones de éstos para lograr infectividad en plantas inoculadas, y detectaron la presencia de una proteína de 48 kDa en extractos de plantas que lograron ser infectadas por estas dos fracciones del gradiente de densidad. Mediante microscopía electrónica serológicamente específica Derrick, *et al.*, (1988) visualizaron *partículas filamentosas que parecían contener un genoma fragmentado que no había sido caracterizado* hasta ese momento. En 1991 da Graca, *et al.*, reportaron la comparación de aislamientos de CRSV, psorosis y otros patógenos de cítricos (relacionados con virus), y sugirieron que las patologías de ringspots y psorosis que afectan a arboles de diferentes regiones del mundo son causados por un virus similar o idéntico, no así goma cóncava, impetriatura y cristacortis.

García, *et al.* (1991) reportaron que las dos fracciones del gradiente de densidad que se requieren para lograr infectividad, pierden esta característica cuando se tratan con RNAsa o bien con Proteinasa K, con lo que corroboraron que el patógeno era una partícula de RNA y proteína. Esta evidencia y el hecho de que observaran la presencia de una proteína de 48 –50 kDa en los tejidos infectados los condujeron a proponer la tesis que el patógeno es un virus con RNA de cadena sencilla de sentido negativo, debido a que en este tipo de virus la partícula de RNA no es infectiva por sí misma. Tal teoría la demostraron Sánchez, *et al.* (1998 and 2000), cuando por medio de hibridaciones encuentran que el RNA de sentido negativo está en mayor proporción en los tejidos infectados que el RNA de sentido positivo.

4.3 Genoma del CPsV

El hecho de que dos fracciones del gradiente de densidad se requieran para obtener infectividad se corroboró en la caracterización de aislamientos de Estados Unidos, Argentina, España y la India, según estos reportes la partícula del fondo tiene un tamaño cinco veces mayor a la de la superficie. En el trabajo reportado por Barthe, *et al.* (1998) se menciona que el componente de la superficie contenía un RNA pequeño que codifica para la proteína de la cápside del virus y en lo reportado por Sánchez, *et al.* (1998) se explica que el componente de la superficie tiene dos RNAs genómicos, el más

pequeño al que denominan RNA3 codifica para la proteína de la cápside. Posterior a estos estudios, al RNA de mayor tamaño que se encuentra en el componente del fondo se le conoce como RNA1 y a los dos componentes de la superficie como RNA2 y RNA3.

Se ha investigado y secuenciado los RNAs genómicos del CPsV para diferentes aislamientos de Argentina, España, Israel, Italia y la India (ver tabla I). Y su genoma se ha descrito y estructurado por varios investigadores para su publicación *on line* a través de la Asociación de Biología Aplicada (ver figura 2).

Tabla I

No. de acceso en banco de genes de secuencias reportadas para aislamientos del CPsV

RNA	No. de acceso en banco de genes	Autores
RNA 3	AFO36338	Barthe, *et al.*, 1998
	AFO36926	Barthe, *et al.*, 1998
	AFO60855	Sánchez, *et al.*, 1998
	AY194900-AY194918	Alioto, *et al.*, 2003
	AY654894	Martín, *et al.*, 2005
	AM159538	Loconsole, *et al.*, 2006
	AY194881-AY194899	Alioto, *et al.*, 2003
RNA 2	AF218572	Sánchez, *et al.*, 2002
	AY654893	Martin, *et al.*, 2005
RNA 1	AF149101-AF149107	Legarreta, *et al.*, 2000
	AY224663	Naum, *et al.*, 2003
	AY654892	Martín, *et al.*, 2005
	AY204675	Vaira, *et al.*, 2003

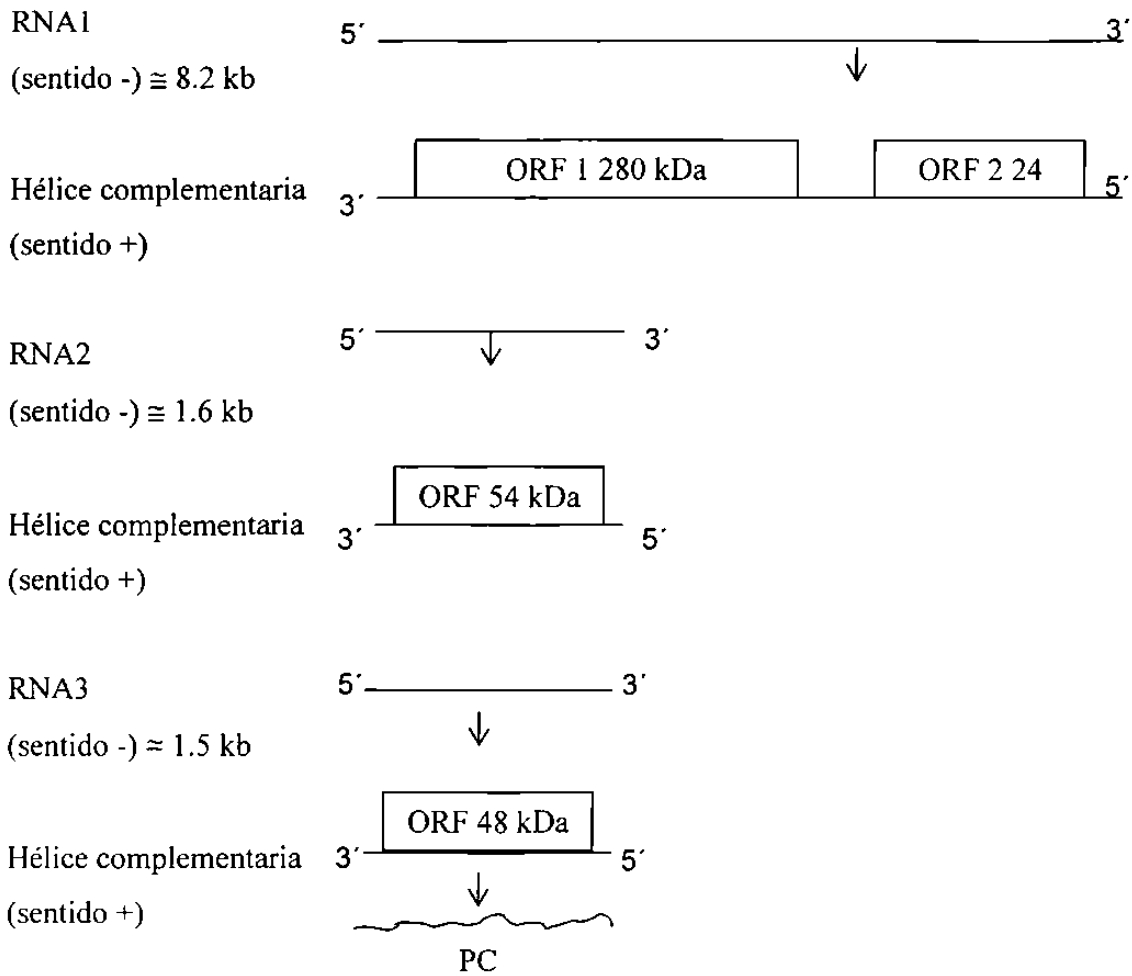


Figura 2. Esquema del genoma del CPsV. El ORF 1 codifica para una proteína de 280 kDa que contiene características de dominios de una polimerasa de RNA dependiente de RNA. El ORF2 del RNA1 está separado del ORF1 por 109 nt y codifica para una proteína de función desconocida y sin homología a las reportadas en las bases de datos. El RNA2 contiene un solo ORF que codifica para una proteína de 54 kDa sin similaridad significativa con las reportadas, pero incluye un motivo de ensamble a una señal de localización nuclear. El RNA3 contiene un ORF que codifica para la proteína de la cápside (PC). (Milne, *et al*.,2003).

4.4 Taxonomía

Las propiedades únicas de este virus condujeron a proponer un nuevo género, en el cual se han incluido recientemente otros virus que no afectan a los cítricos (Vaira *et al.*, 2003, Martín *et al.*, 2005). Debido a la morfología de la partícula viral se propusieron dos nombres: Spirovirus (por que hace referencia a la forma de espiral de la partícula de RNA) y Ophiovirus, del griego ophis= serpiente (García, *et al.*, 1994; Milne RG, *et al.*, 1996). El segundo nombre se propuso formalmente al Comité Internacional de Taxonomía de los Virus (siglas en ingles ICTV) y fue aceptado (ICTV, 2002) por lo que la Organización Internacional de Virólogos de Cítricos (siglas en ingles IOCV) estableció que el término "psorosis" debe ser utilizado para designar solamente aquellas enfermedades en el cual esté involucrado el virus de la psorosis de cítricos el cual debe ser identificado por microscopía, serología, hibridaciones, PCR, etc. (IOCV, 2000). Los datos taxonómicos del virus son:

Grupo: RNA de cadena simple de polaridad negativa: ssRNA (-)
Familia: sin asignar
Género: Ophiovirus
Acrónimo: CPsV

4.5 Distribución del CPsV

La psorosis se encuentra diseminada en todo el mundo (Casafus and Costa, 1984; Sarach, *et al.*, 1988, Byadgi, *et al.*, 1993, Navas *et al.*, 1993a,b; Navas and Moreno, 1995, Skaria, *et al.*, 2002). Las formas en que se propaga son por medio de semilla, injerto y un vector cuya naturaleza se desconoce. Hay evidencia de la transmisión natural de la psorosis, y la existencia de un vector de propagación es muy probable (Garnsey, *et al.*, 1980; Garnsey *et al.*, 1988; Roistacher, 1993; Legarreta *et al.*, 1998) la cual se basa en experimentos en que arboles de cítricos libres del virus que fueron plantados en una misma huerta que arboles infectados, han adquirido la patología (Diamante, *et al.*, 1984).

Para el caso particular de nuestro país hay reportes de la presencia de psorosis en los estados de Veracruz, Tabasco, Nuevo León, lo que indica en parte la poca atención que recibe esta patología debido probablemente a la falta de información y conocimiento sobre la enfermedad y sobre el perjuicio económico que provoca para los productores de cítricos. Los síntomas de la psorosis tales como el descortezamiento y las manchas en hojas y frutos fácilmente se pueden confundir con daños mecánicos o atribuirse a otro tipo de factores como el clima o una fertilización mala, ésto implica el riesgo permanente de la propagación del virus. Se han realizado investigaciones con el objetivo de eliminar el virus en material de propagación de cítricos como injertos de yemas (Arroyo, 1984) y embriogenesis (D'Onghia, *et al.*, 2001), sin embargo la forma más segura de erradicar el virus en plantaciones es por medio de la implementación de programas de certificación (Roistacher, 1993). En México existe un Programa de Certificación de Cítricos implementado por el gobierno federal a través de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), en el cual se requiere que en todas las unidades de producción de material de propagación de cítricos (Lotes donadores de yemas, Lotes de producción de semilla de portainjerto, Lotes de multiplicación) se verifique la ausencia de virus y viroides, entre las cuales está contemplado el virus de la psorosis (NOM-079-FITO-2002 SAGARPA). De aquí la necesidad de la investigación e implementación de métodos de detección del CPsV.

4.6 Métodos de detección

El método tradicional de detección del CPsV, es la inoculación de plantas indicadoras, este método es fidedigno, sin embargo requiere de condiciones controladas, espacio en un invernadero y los resultados se obtienen después de 2 ó 3 meses posteriores a la inoculación. La detección por métodos moleculares representa una alternativa atractiva en la detección oportuna del virus, principalmente la serología y RT-PCR.

La serología se ha utilizado como método de detección del CPsV desde 1988 (Derrick, *et al.*, 1988). Debido a la diversidad biológica de los aislamientos del virus, se continua investigando sobre el desarrollo de anticuerpos (Barthe, *et al.*, 1998; Alioto, *et al.*, 1999; Potere, *et al.*, 1999; Djelouah, *et al.*, 2000; D'Onghia, *et al.*, 2001; Djelouah, *et al.*, 2002; Alioto, *et al.*, 2003) y también se hace investigación sobre las técnicas serológicas más apropiadas (García, *et al.*, 1997; Martín *et al.*, 2002; Alioto *et al.*, 2003, Zanek *et al.*, 2006), con el propósito de mejorar la eficiencia de la detección sobre todo en muestras de campo, en las cuales la concentración del virus puede ser baja ya sea por el grado de desarrollo de la patología o bien por las condiciones ambientales en que se encuentra el tejido (Martín, *et al.*, 2002).

4.7 Detección por RT-PCR

Para el caso de la detección por RT-PCR se investiga acerca de los métodos de extracción de RNA, diseño de iniciadores, condiciones de reacción y tipos de termociclador.

4.8 Métodos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR

En lo que respecta a los métodos de extracción de RNA se debe tomar en cuenta que los tejidos vegetales como las hojas de los arboles de cítricos tienen un alto contenido de compuestos fenólicos que son susceptibles a oxidarse y formar pigmentos que reaccionan entre sí o con proteínas e inhiben enzimas como las que participan en las reacciones de RT-PCR (Kim, *et al.*, 1997). Para evitar la formación de estos compuestos se lleva a cabo la adición de polímeros de alto peso molecular en las soluciones amortiguadoras que se usan para la extracción de ácidos nucleicos, uno de estos polímeros de alto peso molecular es la polivinilpirrolidona (PVP) que absorbe compuestos fenólicos; o también se utilizan agentes caotróficos (desnaturalizantes) que

inhiban la acción de las enzimas fenol oxidasas, como el tiocionato de guanidina o el β mercaptoetanol (Scopes, 1994).

En los procedimientos de extracción de ácidos nucleicos se desarrollan pasos para solubilizar los componentes celulares y desproteinizar los ácidos nucleicos. La mayoría de los procedimientos inician por suspender y solubilizar las células o tejidos en una solución amortiguadora que contenga un agente iónico y un detergente, comúnmente sulfato dodecil de sodio (SDS). Posteriormente las proteínas se desnaturalizan por el uso de solventes orgánicos como el fenol, cloroformo o bien por medio de enzimas como la proteinasa K. Después de la desproteinización la fase orgánica se separa de la fase acuosa por centrifugación, los ácidos nucleicos que son solubles en agua deben ser recuperados de la fase acuosa de la cual se precipitan por la adición de etanol, isopropanol o acetato de sodio. Los procedimientos de extracción difieren (Sambrook, *et al.*, 1989) en cuanto al buffer que se utiliza, el agente de desnaturalización de las proteínas, los procedimientos adicionales de purificación de ácidos nucleicos y la adición de compuestos que inhiban RNAsas o que inhiban la formación de inhibidores de la reacción posterior (en este caso RT-PCR). En la detección por RT-PCR del CPsV se han evaluado diferentes procedimientos de extracción de RNA como extracción con proteinasa K, extracción con TRIzol, extracción y purficación con matriz de sílica (Legarreta, *et al.*, 2000), a fin de investigar cuales son aquellos procedimientos que permitan recuperar la mayor cantidad de RNA viral presente en los tejidos infectados.

4.9 Protocolos de RT-PCR para la detección del CPsV

Para la implementación de una reacción de RT-PCR se deben establecer las siguientes condiciones: concentración de los componentes de la mezcla de reacción (Mg^{2+}, iniciadores, deoxinucleótidos (dNTP´s), unidades de enzima, templado), temperatura de alineamiento, duración de cada paso (desnaturalización, alineamiento, extensión) y número de ciclos. Para cada una de estas condiciones hay parámetros

estándares, sin embargo frecuentemente se necesitan optimar algunos de éstos, debido a que están en función de la secuencia que se pretende amplificar, de la naturaleza del RNA molde y de las secuencias de los iniciadores.

- Para la detección de patógenos por RT-PCR es más fácil y práctico amplificar secuencias cortas (200-600 pb). La longitud de la secuencia a amplificar influye en la concentración que se debe emplear de los componentes de reacción, así como en la duración del tiempo de extensión. Por lo general se requiere de 1 minuto a 72 °C para la eficiente amplificación de secuencias de una longitud menor de 1000 nucleótidos.

- La naturaleza del RNA molde en el caso del CPsV es RNA viral que esta en menor concentración en los extractos en comparación con el RNA propio de los tejidos infectados, por tal motivo se debe utilizar una cantidad mayor de RNA total a la que se utiliza cuando se amplifica una secuencia del RNA genómico de la planta, por otra parte hay autores que proponen el desarrollo de reacciones *heminested* para hacer más eficiente la amplificación de la secuencia blanco (Legarreta, *et al.*, 2000). También debe considerarse que este RNA viral se puede encontrar superenrrollado (Vaira, *et al.*, 1997) obstaculizando así el alineamiento de los iniciadores con el RNA, por tal motivo algunos protocolos diseñados incluyen un calentamiento inicial de la mezcla de iniciadores y RNA viral seguido por una incubación en hielo (Barthe, *et al.*, 1998), aunque también se han evaluado reacciones en un solo paso para la detección del CPsV (Sambade, *et al.*, 2000) y reacciones para la detección simultánea del CPsV y otros virus (Roy *et al.*, 2005).

- La especificidad de una reacción es el resultado que los iniciadores se alineen precisamente a solo una cadena de DNA. Se deben escoger dos secuencias cortas, las cuales estén separadas por una longitud de secuencia conocida, normalmente los iniciadores tienen entre 18 y 28 nucleótidos de longitud suficientes para asegurar secuencias únicas. En los iniciadores debe haber un 50% de dG + dC, que permita aumentar su temperatura de desnaturalización (Tm) y por ende la temperatura de

alineamiento (Tali = Tm – 25 °C) en el protocolo de RT-PCR, y de esta manera asegurar que la reacción sea específica. Para el caso de detección del CPsV se han evaluado varias secuencias de iniciadores (Tabla II) así como dos tipos de termociclador (Sambade, *et al.*, 2000), un termociclador con calentamiento por placa metálica y un termociclador con calentamiento por medio de aire. La temperatura y duración de cada paso de la reacción y número de ciclos dependerán de la longitud y contenido de dG + dC de los iniciadores, longitud del fragmento que se pretenda amplificar, así como el tipo de termociclador que se utilice.

Tabla II

Secuencias de iniciadores diseñados para la detección del CPsV

Iniciador sentido	Iniciador antisentido	Autores
GAGGAAGGTATTTCCATAGG	CCTATAAATGATAATTGCAC	Sambade, *et al.*, 2000
TTATCAGGAGGCTTCAAC	GCTGTTATTACTAATTGTAAG	Sambade, *et al.*, 2000
ACAATAAGCAAGACAAC	CCATGTCACTTCTATTC	García, *et al.*, 1997
GCTTCCTGGAAAAGCTGATG	TGCTTTTTGTCAACACACTCC	Barthe, et al., 1998
ACAATAAGCAAGACAAC	CCTATTAATGATAATTGC	Legarreta, *et al.*, 2000
GAGGAAGGTATTTCCATAGG	CCTATTAATGATAATTGC	Legarreta, *et al.*, 2000

Hay cuatro publicaciones internacionales acerca de protocolos de RT-PCR para la detección del CPsV, y en las cuatro los protocolos están evaluados con muestras de plantas de invernadero inoculados con diferentes aislamientos del virus. Lo que refleja una necesidad de evaluar este método de detección con muestras de campo. Este aspecto es muy importante ya que la detección del virus por RT-PCR se puede ver afectada por

las condiciones ambientales de los tejidos, como ocurre para lo reportado en detección por serología.

4.10 Teoría sobre RT-PCR tiempo real

La detección del CPsV por RT-PCR convencional permite verificar la presencia o ausencia del virus, la implementación de un protocolo de RT-PCR tiempo real permitirá evaluar la carga viral en los tejidos infectados lo que puede ser una herramienta valiosa en el estudio de la psorosis.

La carga viral es un indicador útil que permite conocer si una infección es activa, brinda información acerca de la extensión de infecciones, así como la interacción del virus y el huésped. En estudios en que se ha utilizado el RT-PCR se le ha considerado un marcador útil de la progresión del desarrollo de patologías. La severidad de enfermedades se ha correlacionado con la carga viral determinada por PCR tiempo real, permitiendo evaluar la carga viral en la reactivación o persistencia en la progresión de patologías. Esta metodología se ha implementado para el estudio de patologías que afectan a humanos como las provocadas por citomegalovirus (Roberts, *et al.*, 1998; Rollag, *et al.*, 1998; Nitsche, *et al.*, 2000; Tanaka, *et al.*, 2000; etc.), virus de la hepatitis (Ishiguro, *et al.*, 1995; Abe, *et al.*, 1999; Martell, *et al.*, 1999; Kawai, *et al.*, 1999; etc.), herpesvirus (Kennedy, *et al.*, 1998; Schalasta, *et al.*, 2000; etc.), el virus Epstein-Barr (Kimura, *et al.*, 1999; Lo, *et al.*, 1999; etc.), el virus del dengue (Laue, *et al.*, 1999), virus de inmunodeficiencia adquirida (Holodniy, *et al.*, 1991; Menzo, *et al.*, 1992; Schutten, *et al.*, 2000; etc.), virus de varicela zoster (Furuta, *et al.*, 2001; Loparev, *et al.*, 2000; etc.); en diversas enfermedades provocadas por virus en animales; y en plantas se han implementado para detectar el virus del mosaico de chícharos (Skaf, *et al.*, 2000) el virus de marchitamiento y manchado en tomates (Roberts, *et al.*, 2000), dos virus que afectan a las orquídeas (Eun, *et al.*, 2000), el virus del mosaico del tabaco (Levi, *et al.*, 2004), entre otros.

Por otra parte la detección por RT-PCR en tiempo real puede ser más sensible que por RT-PCR convencional, de acuerdo a los diseñadores de los ensayos de RT-PCR tiempo real es posible detectar hasta una copia del fragmento que se amplifica.

En PCR tiempo real se monitorean las copias del fragmento que se amplifica por medio del uso de compuestos químicos que al unirse al DNA de doble cadena emiten una fluorescencia (bromuro de etidio y SYBR® green) o bien por el uso de oligonucleótidos (oligonucleotidos scorpion, oligonucleotidos hairpin, entre otros) y/o sondas fluorescentes (como la sonda TaqMan) ver figura 3.

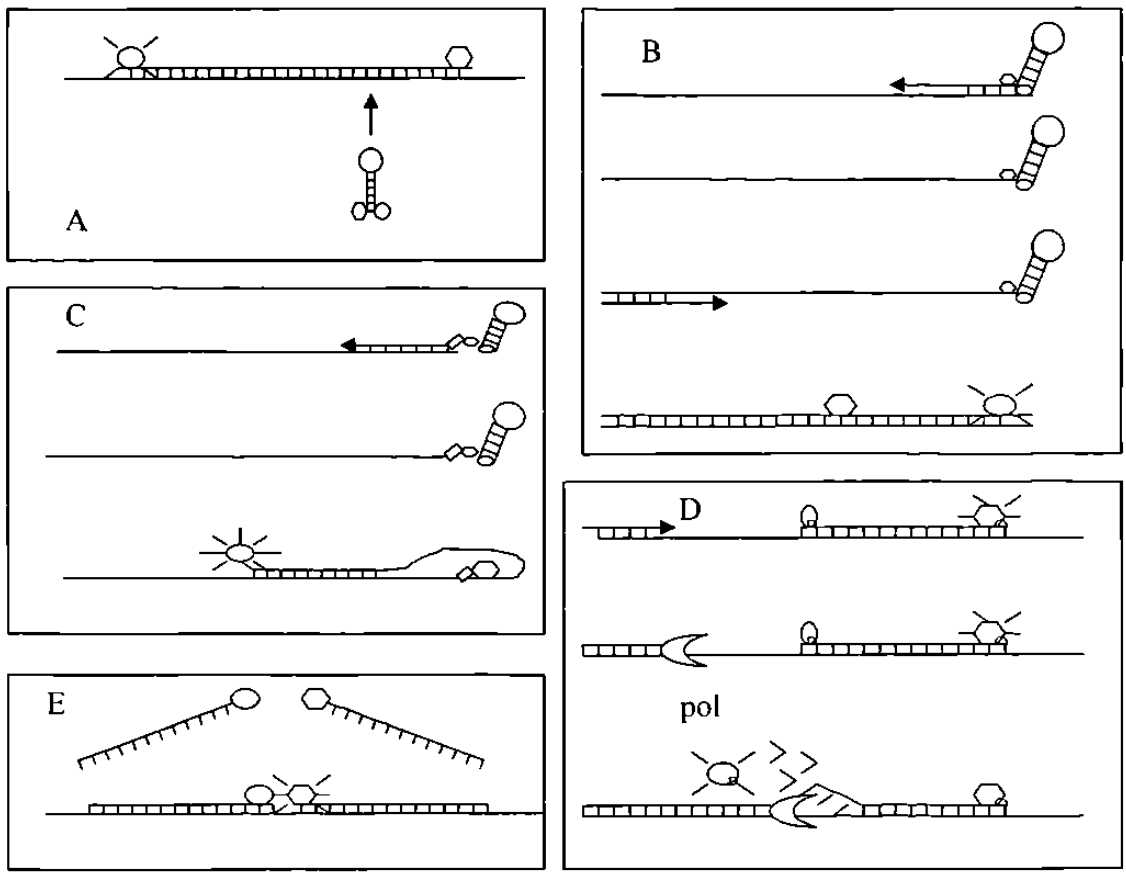


Figura 3. Esquemas de los compuestos químicos fluorescentes para PCR tiempo real. A Oligopruebas hairpin, en el momento en que la oligoprueba hibrida con el DNA blanco el fluoróforo se separa del quencher lo suficiente para que el fluoróforo emita fluorescencia. B Iniciadores sunrise, la hélice complementaria de DNA se duplica de tal manera que la estructura del iniciador hairpin se rompe para permitir la emisión de fluorescencia de manera similar a lo que sucede con las oligopruebas hairpin. C Iniciadores scorpion. D Sonda Taqman, conforme la DNA polimerasa se extiende a través de la helice que se duplica se hidroliza la sonda, al separarse el fluoróforo del quencher se emite la fluorescencia. E Oligopruebas adyacentes, en este caso las oligopruebas no requieren extensión de hecho estas bloquean la extensión, la fluorescencia se emite cuando se unen dos compuestos mediante la hibridación al DNA blanco (Mackay *et al.*, 2002).

Los criterios para elegir el compuesto químico fluorescente así como para el diseño de oligonucleótidos o sondas fluorescentes son: que se una fácilmente al DNA, se detecte a baja concentración, produzca una señal alterada por medio de hibridación específica, sea seguro biológicamente, sea estable a temperaturas elevadas y no interfiera con la actividad de la DNA polimerasa.

Los ensayos de RT-PCR en tiempo real se desarrollan bajo condiciones estándares que están definidas por el equipo que se utiliza y las condiciones a las que deben emplearse las enzimas y reactivos de la mezcla de reacción. Al igual que para RT-PCR convencional se debe diseñar la secuencia de los iniciadores y de la sonda (si es que se utiliza), se debe establecer cual es la concentración óptima tanto de los iniciadores, como del compuesto químico fluorescente. A baja concentración de éstos puede fallar la amplificación o no ser detectada y a alta concentración pueden generarse datos sobrestimados por la formación de dímeros de oligonucleotidos o, por exceso del compuesto fluorescente no detectarse la amplificación.

El valor de ciclo umbral (en inglés threshold cycle, C_T) se utiliza como un indicador de que hay amplificación del fragmento de interés. El C_T es el ciclo en el cual la fluorescencia generada por la acumulación de copias del fragmento que se amplifica, es mayor a 10 veces la desviación estándar de los valores de fluorescencia de la línea base (utilizando los datos del ciclo 3 al 15). El C_T es inversamente proporcional al número de copias del fragmento presentes en la muestra. De tal manera que a mayor número de copias en la muestra corresponde un valor de C_T menor, que a un menor número de copias.

Al implementar un protocolo de PCR cuantitativo se debe realizar curva estándar, en este tipo de ensayos se debe conocer el número de copias o bien la cantidad de RNA o DNA molde en la muestra y se obtiene el C_T para cada una de las muestras estándares. Los datos generados por esta curva estándar permiten posteriormente

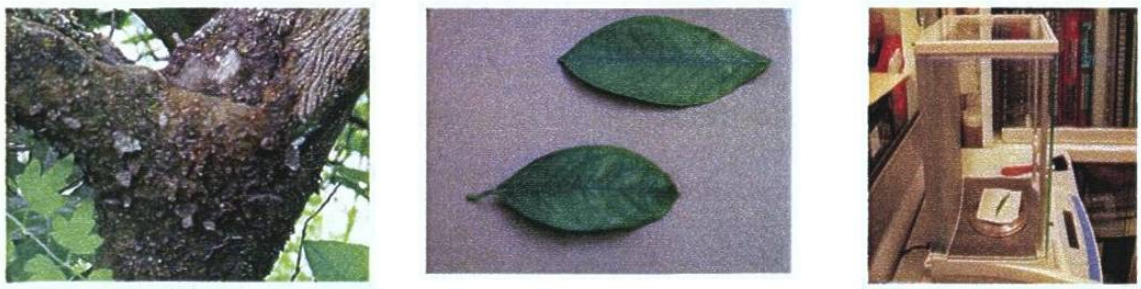
conocer la cantidad desconocida de copias presentes en una muestra por interpolación con el valor de C_T que proporciona el equipo (Mackay, *et al*, 2002).

Para la detección del CPsV no hay protocolos de RT-PCR tiempo real implementados. Dado que se considera que podría ser un método fidedigno en la detección del CPsV y que ofrecería la ventaja de poder determinar carga viral en tejidos infectados, el objetivo general de esta tesis es implementar un método cuantitativo mediante RT-PCR tiempo real para la detección del CPsV.

MATERIALES Y MÉTODO

5.1 Material biológico

Se tomaron muestras de hojas de diez arboles de naranja Mars afectados por el CPsV (denominados GT01 2-15, 3-5, 3-10, 4-17, 5-14, 6-17, 10-12. 11-20, 16-11 y 16-14) que muestran el síntoma de descortezamiento en el tronco, y de 8 arboles aledaños a éstos, (denominados (GT01 2-14, 3-4, 3-9, 4-16, 5-13, 6-16, 10-11 y 11-19)) ubicados en una huerta del municipio de General Terán (denominada GT01), Nuevo León, México. Se hicieron dos colectas de muestras una se realizó en invierno y la otra en los inicios de primavera. Las muestras colectadas en invierno de arboles con síntomas se utilizaron para la evaluación de los protocolos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR convencional y las muestras colectadas en primavera de los arboles con síntomas y sín síntomas se utilizaron para la implementación y evaluación del protocolo de RT-PCR tiempo real. Se manejó como control positivo hojas de una planta de invernadero inoculada con el CPsV. Las hojas de cada árbol y de la planta control se lavaron, secaron y se formaron paquetes de 0.10, 0.25 y 4 g que se almacenaron a –20 °C hasta que se hicieron las extracciones de RNA.



A B C

Figura 4. Síntomas en arboles afectados por el CPsV. A) descortezamiento en tronco, B) manchas en hojas y C) pesado de hojas.

5.2 Evaluación de métodos de extracción de RNA en la detección del CPsV por RT-PCR

Se realizaron extracciones de ácidos nucleicos por triplicado por cinco procedimientos para muestras obtenidas de los diez arboles evaluados así como de muestras de la planta que se manejo como control positivo. Se realizaron electroforesis de alícuotas de cada uno de los extractos, se obtuvo su relación de absorbancias a 260 y 280 nm ($A_{260nm/280nm}$) y se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR con cada uno de los extractos para la detección del CPsV.

5.2.1 Extracciones de RNA con proteinasa K

En un mortero se pulverizaron 0.25 g de hoja con nitrógeno líquido, se transfirió el polvo a un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le agregó 1 ml de amortiguador TACM (0.05 M Tris-HCl pH 8, 0.1% de ácido ascórbico, 0.1% de cisteína y 0.5% de 2-β mercaptoetanol). La mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C (centrífuga Hettich, modelo Universal 30F), una alícuota de 270 µl del sobrenadante se trató con 0.2 mg/ml de proteinasa K (BIOLINE) y 1% p/v de sulfato-dodecil de sodio (SDS), se incubó a 37 °C por 30 min. Luego se agregaron 0.5 ml de SEVAG (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 v/v) y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C, se tomaron 350 µl de la fase acuosa y se mezclaron con 1.05 ml de etanol frío y 35 µl de acetato de sodio 3 M. La mezcla se dejó reposar por 1 hora a 70 °C y enseguida se centrifugó a 5000 rpm por 30 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Se permitió que se evaporara el etanol y el precipitado se resuspendió en 80 µl de agua estéril libre de RNAsas (García *et al.*, 1997).

5.2.2 Extracción de ácidos nucleicos mediante cromatografía en columnas de celulosa (extracción con celulosa)

Se realizaron extracciones de RNA de acuerdo al procedimiento descrito por Almeyda *et al.*, (2003).

5.2.3 Extracción con amortiguador GPS más PVP, macerando el tejido con nitrógeno líquido (extracción con GPS más PVP c/N_2)

Se trituraron 0.25 g de hojas con nitrógeno líquido y al macerado se le agregaron 1.13 ml amortiguador GPS más PVP pH 9.6 (glicina 0.2 M, Na_2HPO_4 0.1 M, NaCl 0.6 M y PVP al 1% p/v), 12.5 µl de 2-β mercaptoetanol, 125 µl de SDS al 10%, 150 µl de fenol saturado a pH 8.0 y 163 µl de SEVAG. La mezcla se agitó en vortex por 15 s y centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C (centrífuga Hettich, modelo Universal 30F). Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de SEVAG, se mezcló y centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C. Al sobrenadante se le agregaron tres volúmenes de etanol frío y 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, se mezcló y almacenó por 1 h a –70 °C. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó dos veces con etanol al 70%. Se permitió que se evaporara el etanol, y el precipitado se resuspendió en 80 µl de agua estéril libre de RNAsas.

5.2.4 Extracción con amortiguador GPS más PVP, macerando el tejido con la solución amortiguadora (extracción con GPS más PVP s/N_2)

Se trituraron 0.25 g de hojas con 2 ml de amortiguador GPS más PVP, a 750 µl de la suspensión de tejido macerado se le agregaron 12.5 µl de 2-β mercaptoetanol, 125 µl de SDS al 10%, 150 µl de fenol saturado a pH 8.0 y 163 µl de SEVAG. La mezcla se agitó 15 s y centrifugó a 5,000 rpm por 15 min a 4 °C. Se continuó el procedimiento de extracción de la misma manera que se describe para las extracciones con buffer GPS más PVP macerando el tejido con nitrógeno líquido. Los procedimientos 5.2.3 y 5.2.4 se realizaron modificando los descritos por Milne *et al.* (1996) y Almeyda *et al.* (2003).

5.2.5 Extracciones de RNA con TRIzol

Se realizaron extracciones con el reactivo comercial TRIzol (Molecular Research Center, Inc.) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante, para cada extracción se utilizaron 0.1 g de tejido y la pastilla de RNA obtenida se resuspendió en 30 µl de agua libre de RNAsas.

5.2.6 Evaluación de la calidad de los extractos de RNA

Se evaluó la calidad de los extractos de RNA obtenidos por los cinco métodos antes descritos para comparar las relaciones de absorbancias $A_{260/280}$ realizadas en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Evaluaciones adicionales incluyeron observación en geles de agarosa al 0.8% (Sambrook *et al.*, 1989).

5.2.7 RT-PCR

5.2.7.1 Protocolo de Barthe, *et al.*, 1998

A alícuotas de 7 µl de RNA se agregaron 20 picomoles de los iniciadores CPV1(5´GCTTCCTGGAAAAGCTGATG 3´) y CPV2 (5´TCTGTTTTTGTCAACACACTCC 3´) (Barthe *et al.*, 1998) y 4 µl de amortiguador para RT 5X (Invitrogen™). Las mezclas se incubaron a 95 °C por 5 min e inmediatamente se transfirieron a hielo donde se mantuvieron por 2 min y enseguida por 30 min a temperatura ambiente. Se agregaron 200 U de Transcriptasa Inversa M-MLV (Invitrogen™), 2 µl de DTT y dNTP´s a una concentración 250 mM, las reacciones de transcripción inversa (RT) se llevaron a cabo en un termociclador (Minicycler™, MJ Research) por una hora a 37 °C. Para la reacción de PCR se emplearon 2 µl de la RT, 25 µl de amortiguador para PCR, iniciadores a una concentración 0.5 µM, $MgCl_2$ a una concentración 2 mM, oligonucleotido a 200 µM y 1.5 U de enzima *Taq* polimerasa Platinium (Invitrogen™). El programa del termociclador fue: desnaturalización a 94 °C por 30 s y posteriormente 35 ciclos de: 94 °C por 30 s, 50 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C por 10 min. Se realizaron electrofóresis de alícuotas de 5 µl de cada uno de los productos de la PCR en geles de agarosa al 1.5% que posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio.

5.2.7.2 Protocolo de Legarreta, *et al.*, 2000

También se realizaron reacciones de RT-PCR para la detección del CPsV utilizando iniciadores con las secuencias propuestas por Legarreta, siguiendo el mismo protocolo descrito que para el caso de los iniciadores propuestos por Barthe. La secuencia del iniciador sentido, primer 6, es 5´GAGGAAGGTATTTCCATAGG 3´ y la

del antisentido, primer 7, es 5´CCTATTAATGATAATTGCAC 3´ (Legarreta *et al.*, 2000).

5.3 Implementación del protocolo de RT-PCR tiempo real para la detección del CPsV

Para la implementación de la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron estándares de cuantificación de DNA y RNA del CPsV, se evaluaron dos diseños de iniciadores y sonda Taqman y se realizaron curvas de calibración.

5.3.1 Obtención de estándares de concentración de DNA y RNA del CPsV como controles de cuantificación para RT-PCR tiempo real

Para la obtención de estándares de concentración conocida de DNA y RNA del CPsV, se llevaron a cabo extracciones de ácidos nucleicos a partir de una muestra de la planta de invernadero y de una muestra de un árbol de campo, reacciones de RT-PCR de fragmentos de 600 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV, purificación de los fragmentos, cuantificación, clonación del fragmento de 600 pb procedente de la muestra de la planta de invernadero, obtención de RNA *in vitro* mediante trancripción del fragmento clonado en un vector TOPO pCR®4 y cuantificación del RNA obtenido.

5.3.1.1 Extracción de ácidos nucleicos

Se realizó extracción de ácidos nucleicos de hojas de una planta de invernadero infectada con el virus psorosis y de hojas del árbol de campo, utilizando el reactivo comercial TRIzol y siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante (Molecular Research Center, Inc.).

5.3.1.2 Amplificación mediante RT-PCR de un fragmento de 600 pb que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV

Se realizaron RT-PCR´s de un solo paso. Las mezclas de reacción contenía 10 µl del extracto de ácidos nucleicos, 25 µl de mezcla de reacción (solución amortiguadora con una concentración 0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM de $MgSO_4$), 12 µl de agua mQ estéril, 1 µl de iniciadores en solución (20 µM) y 1 µl de mezcla de enzimas RT/Taq Platinium® (Invitrogen™). La secuencia de iniciadores que se empleó para la amplificación fue: 5´GCTTCCTGGAAAAGCTGATG 3´ para el iniciador en la dirección sentido y 5´TCTGTTTTTGTCAACACACTCC 3´ para el iniciador en la dirección antisentido. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Minicycler™ (MJ Research). El protocolo de la reacción consistió primero en un paso de 30 min a 50 °C seguido de una desnaturalización a 94 °C por 30 s y posteriormente se desarrollaron 35 ciclos : 94 °C por 15 s, 50 °C por 30 s, y 72 °C por 1 min, y se realizó una extensión final a 72 °C por 10 min. Alícuotas de 3 µl de cada uno de los productos de la RT- PCR se sometieron a una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% que se tiñó con bromuro de etidio.

5.3.1.3 Purificación del fragmento amplificado y obtención de un estándar de concentración de DNA

Se llevó a cabo la electroforésis de los productos de RT-PCR en geles de agarosa al 1.5% preparado con solución amortiguadora TAE (trizma base-ácido acético-EDTA) y se tiñó con bromuro de etidio, se cortó la banda del gel donde se visualizó el fragmento de 600 pb. El DNA se recuperó desde la agarosa por medio de una matriz de sílica (incluida en el kit QIAGEN para purificación de DNA) siguiendo el procedimiento descrito por el fabricante.

Para la obtención del estándar de concentración de DNA se cuantificó el fragmento purificado obtenido a partir de una muestra del árbol de campo por espectofotometría.

5.3.1.4 Clonación del fragmento de DNA amplificado por PCR

El fragmento de 600 pb purificado obtenido a partir de la planta de invernadero se clonó en el vector TOPO pCR®4. A 10 µl del DNA purificado se le agregaron 0.25 µl de mezcla de las enzimas RT/Taq Platinium (Invitrogen™) y 1 µl de dATP's (2.5 mM) y se incubó la mezcla a 72 °C por 2 minutos.

Se mezclaron 2 µl del producto anterior con 1 µl de solución salina (1.2 M de NaCl y 0.06 M de MgCl2) y 1 µl del vector TOPO pCR®4 (incluidos en el kit para clonación® TOPO TA). Se incubó la mezcla por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se colocó en hielo.

5.3.1.5 Transformación de células competentes

Se agregaron 2 µl de la reacción de clonación a un vial de células competentes OneShot® TOP10 y se transfirió el tubo con la mezcla a hielo, donde se incubó por 5 minutos. Se calentó la suspensión celular a 42 °C por 30 s sin agitar. Inmediatamente se transfirió el vial a hielo. Enseguida se agregaron 200 µl de medio SOC y se incubó la mezcla a 37 °C por una hora. Se dispersaron 50 µl de la mezcla de células transformadas en placas de medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (50 µg/ml) y se incubaron a 35 °C por 24 horas.

5.3.1.6 Selección de células transformadas

Se numeraron las colonias que crecieron en medio LB con ampicilina. Se seleccionaron 10 colonias al azar, y se sembraron en 5 ml de caldo LB con ampicilina. Los medios inoculados se incubaron a 35 °C por 24 horas. Se centrifugaron los medios de cultivo a 10 000 *xg* por 2 minutos. Se retiraron los sobrenadantes y las pastillas formadas se resuspendieron en 100 µl de solución de lisis alcalina I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris-Cl pH 8.0 y 10 mM de EDTA). Se agregaron 200 µl de solución de lisis alcalina II (NaOH 0.2 N y SDS al 1%) y se mezclaron por inversión varias veces. Se agregaron sobre hielo 150 µl de solución de lisis alcalina III (solución 3 M con respecto a potasio y 5 M con respecto al acetato) fría, y se mezcló por invertir el tubo varias veces. Se centrifugó el lisado bacterial por 5 min a 10 000 *xg*. Se agregó un volumen

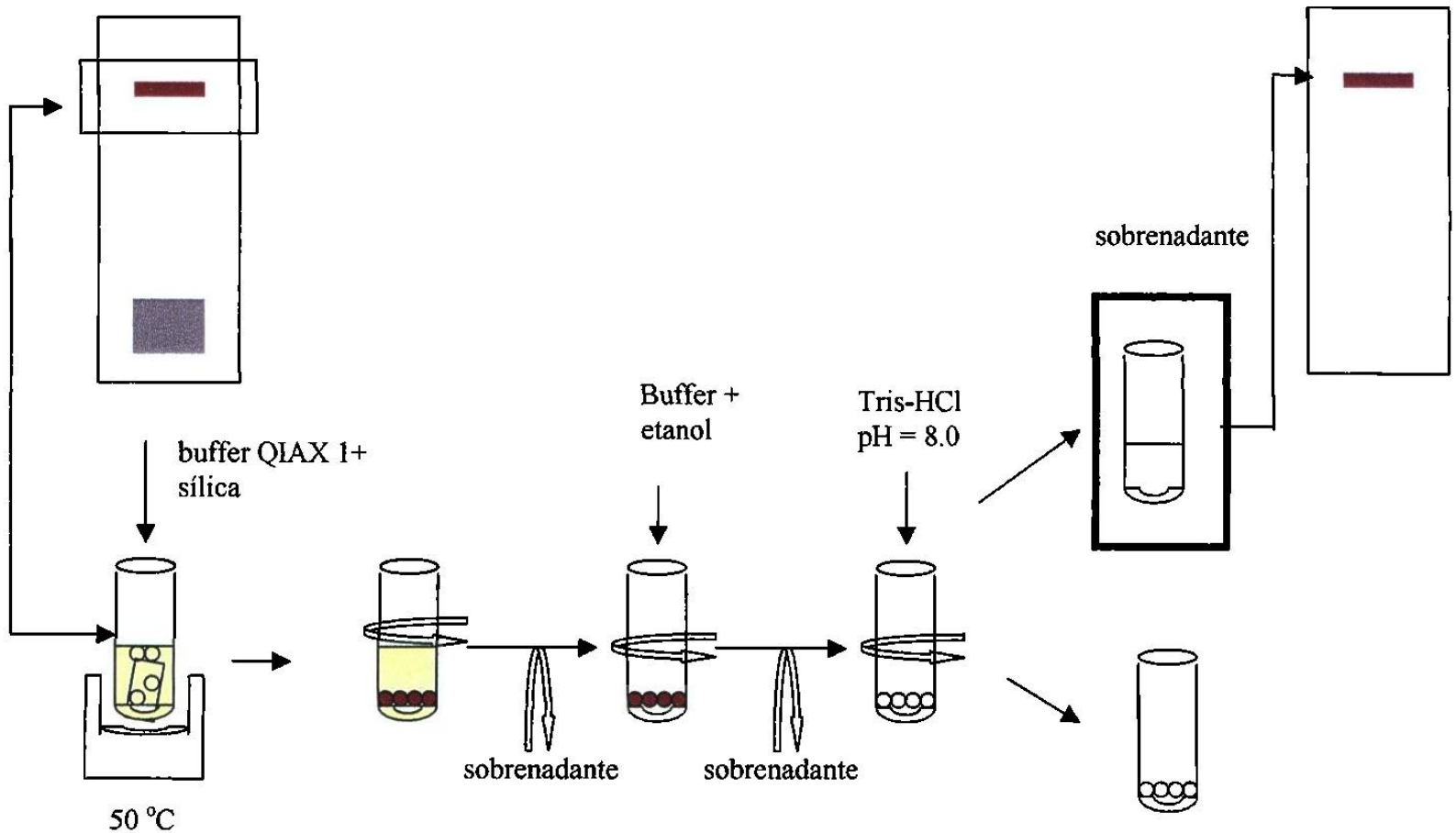


Figura 5. Esquema de la estrategia de purificación de los fragmentos de 600 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV (QIAGEN, Inc.).

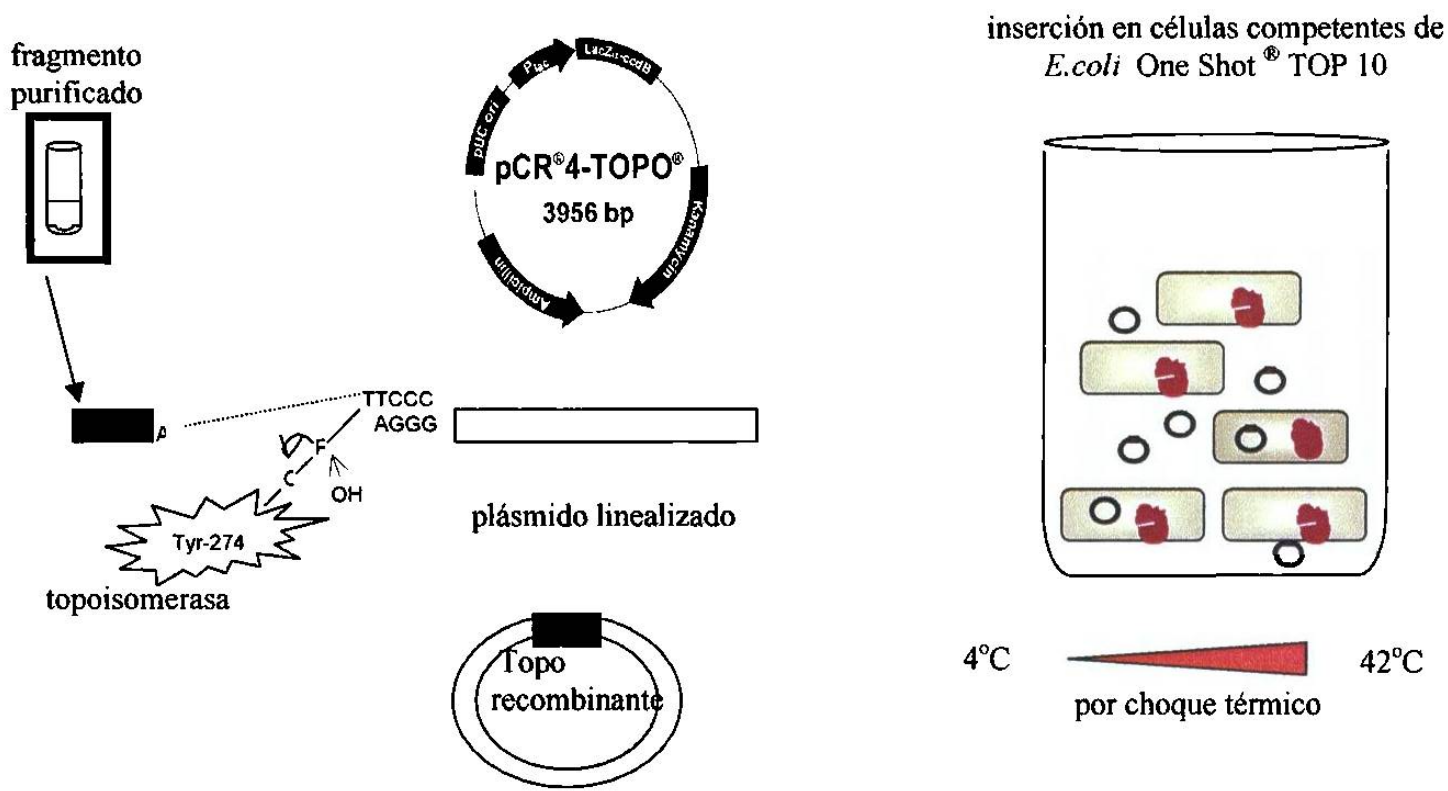


Figura 6. Esquema de la estrategia de clonación del fragmento de 600 pb del gen de la proteína de la cápside del CPsV

equivalente de SEVAG y se centrifugaron las mezclas por dos minutos a 10 000 *xg*. Se transfirieron las fases acuosas a tubos nuevos y se agregó a cada tubo 1 ml de etanol al 100% y se permitió que se estabilizara la solución a temperatura ambiente por dos minutos. Se colectaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 10 000 *xg* por 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes y se agregaron a cada tubo 1 ml de etanol al 70%. Se recuperaron los ácidos nucleicos por centrifugación a 10 000 *xg* por 5 min. Se eliminaron los sobrenadantes y se permitió que se evaporará el etanol. La pastilla formada se resuspendió en 50 µl de solución amortiguadora TE (Trizma Base-EDTA) que contenía 20 µg/ml de RNAsa (Sambrook *et al.*, 1989).

Para verificar la obtención de DNA plasmídico se sometieron a electroforesis alícuotas de la extracción de DNA plasmídico en geles de agarosa al 0.8 %. Posteriormente se realizó la digestión de DNA plasmídico con la enzima *Eco*R I, y se realizó la electroforesis de las digestiones obtenidas en gel de agarosa al 1.5 %.

5.3.1.7 Obtención de estándar de concentración de RNA

Se aisló la cepa transformada, seleccionada por tener plásmido con el inserto de 600 pb, en medio LB con ampicilina. Se realizaron cultivos de esta cepa y se obtuvo DNA plasmídico. El DNA plasmídico se digirió con la enzima *Pvu* II, y el producto de esta digestión se utilizó como molde para transcripción *in vitro* de un fragmento híbrido de DNA (del vector TOPO y del inserto de 600 pb) de 797 pb siguiendo el protocolo de reacción para la enzima RNA polimerasa T3 (del kit Ribopruebas), para mayores detalles revisar apéndice A. En el producto de la transcripción se eliminó el DNA residual por la adición de DNAsa I. El RNA se cuantificó en un fluorómetro Quantech™ con los reactivos del kit Ribogreen (Invitrogen™).

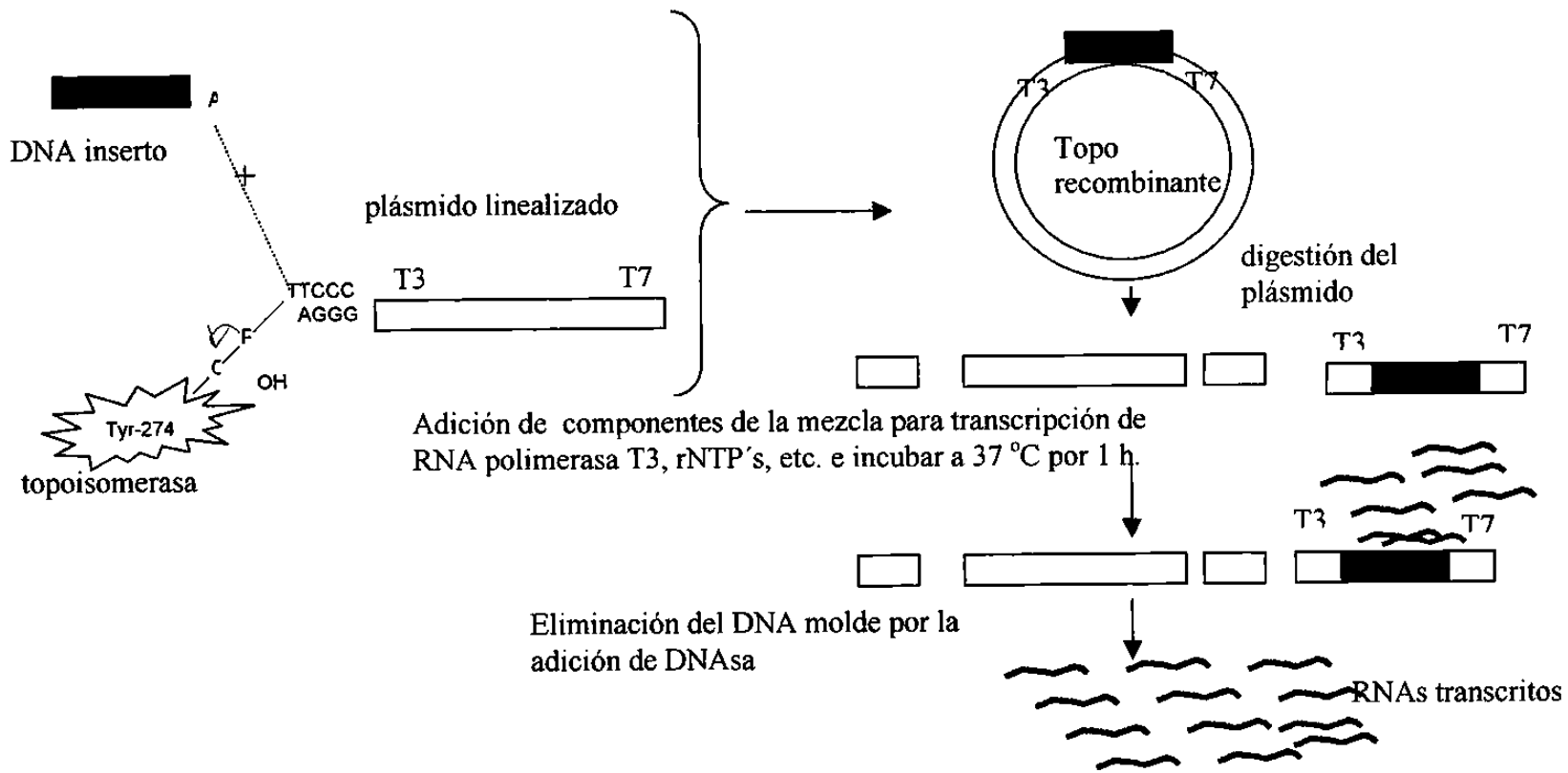


Figura 7. Estrategia de transcripción *in vitro* de un fragmento híbrido de 797 rNTP's (formado por un fragmento del vector TOPO pCR®4 y el fragmento de 600 pb del gen de la proteína de la cápside del CPsV)

5.3.2 Diseño de iniciadores y sonda Taqman para RT-PCR tiempo real.

Se eligió como base la secuencia AFO36338 reportada en el banco de genes (NCBI) para realizar un análisis BLAST, se encontraron dos secuencias consenso para 22 secuencias reportadas en el banco de genes, esta información se proporcionó a la compañía Applied Biosystem de México para el diseño de un conjunto de iniciadores y sonda Taqman para RT-PCR tiempo real ver apéndice B. Las secuencias de este conjunto de reactivos se muestran en la tabla III.

Posteriormente se obtuvo la secuencia de un fragmento de 559 bases del gen de la proteína de la cápside obtenido de una muestra de un árbol de campo, y dicha secuencia se analizó por medio del programa Primers expres™ , con base en los resultados de este análisis se seleccionaron un conjunto de iniciadores y sonda atendiendo las características de contenido de GC, temperaturas de desnaturalización y la no formación de dímeros, ver tabla IV y ver apéndice C.

Tabla III

Secuencias de iniciadores y sonda Taqman obtenidos a partir de la secuencia AFO36338

	Secuencia	Tm	%GC
Iniciador sentido	ATAACTTGCCAAGTGCTGTTTGC	66	44
Iniciador antisentido	GCATACCTCACAGATCGATTTCC	68	48
Sonda Taqman	FAMCCAGATGCAAACTGAATMGBNFQ	70	44

Tabla IV

Secuencias de iniciadores y sonda Taqman seleccionados para efectuar RT-PCR tiempo real con base en la secuencia obtenida de un fragmento de 559 bases que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV

	Secuencia	Tm	%GC
Iniciador sentido	GGGTTTGCGAGCAGTTTTCA	60	50
Iniciador antisentido	GATTCAGGAGTTGCACCAACAG	58	50
Sonda Taqman	FAMCAAGCAAAAGTTGTCCCCTMGBNFQ	69	47

5.3.3 Evaluación de los diseños de iniciadores y de la sonda

5.3.3.1 Evaluación del diseño con base en la secuencia reportada en el banco de genes AFO36338

La evaluación de la sonda Taqman y de los iniciadores se realizó en PCR tiempo real con DNA del fragmento de 600 pb del gen que codifica para la proteína de la cápside del CPsV y con DNA plásmido conteniendo el fragmento de 600 pb del CPsV. Posteriormente se llevo a cabo RT-PCR tiempo real utilizando como RNA molde RNA total de muestras de campo. El programa que se utilizó para la PCR tiempo real en el equipo 7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems consiste en un primer paso a 50 °C por 2 min, seguido por 95 °C por 10 min y 40 ciclos de 95 °C por 15 s y extensión a 60 °C por 1 min y para la RT-PCR tiempo real fue similar a la PCR con la diferencia que el primer paso a 50 °C se prolongó a 30 min. Se emplearon los reactivos del Mix Master Taqman® Applied Biosystem para PCR tiempo real para un volumen final de 20 µL. En las evaluaciones se trabajó con concentraciones de la sonda Taqman de 0.25 y 0.35 µM para los iniciadores 0.5 y 0.65 µM, y con cantidades de DNA plásmido de 2.95 a 2.95 x 10^{-8} ng y de DNA desde 0.2 ng a 2 x 10^{-7} ng, así como con 2.5 µl de RNA total obtenido en las extracciones.

5.3.3.2 Evaluación de los iniciadores y de la sonda para tiempo real diseñados con base en la secuencia obtenida a partir de una muestra de campo

La evaluación de la sonda Taqman y de los iniciadores obtenida con base en la secuencia de la muestra de campo, se realizó primero con reacciones de PCR tiempo real, utilizando como DNA molde el DNA purificado y cuantificado por espectofotometría. El programa que se utilizó para la PCR tiempo real es el mismo que se menciona en el apartado 5.3.3.1 y nuevamente se emplearon los reactivos del Mix Master Taqman® Applied Biosystem para PCR tiempo real para un volumen final de 10 µl. En esta evaluación se trabajó con concentraciones diferentes de la sonda Taqman y de los iniciadores, ver tabla V, para cada combinación de concentración se manejó también un blanco (mezcla de reactivos sin DNA molde).

Tabla V

Combinaciones de concentraciones de iniciadores y sonda Taqman evaluadas en PCR tiempo real

Combinación	Sonda Taqman*	Iniciadores*
1	0.25	0.5
2	0.25	0.25
3	0.25	0.15
4	0.15	0.5
5	0.15	0.15
6	0.15	0.15
7	0.1	0.5
8	0.1	0.15
9	0.1	0.15

* concentraciones µM

5.3.4 Curvas estándar para RT-PCR tiempo real

Se realizó una curva estándar para RT-PCR tiempo real con 9 muestras de concentración conocida de DNA (del fragmento de 600 pb purificado y cuantificado por espectofotometría) por duplicado y un blanco (mezcla de reactivos sin DNA), se trabajó con un volumen final de 10 µl y con una concentración de la sonda Taqman de 100 nM y de los iniciadores 150 nM. Se realizó una segunda curva de calibración con 7 muestras estándares de concentración por duplicado y un blanco, se trabajó con un volumen de reacción de 20 µl y una concentración de la sonda Taqman de 150 nM y de los iniciadores 250 nM.

Se obtuvo una curva estándar con 5 muestras estándares de RNA transcrito *in vitro* (cuantificado por fluorometría) por duplicado y un blanco, se trabajó con un volumen de 20 µl y una concentración de la sonda Taqman de 150 nM y de los iniciadores de 250 nM.

5.4 Detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo

Se realizaron extracciones de RNA con TRIzol, con 9 µl de los RNA's obtenidos con el reactivo TRIzol de muestras de hojas de los arboles con síntomas y sin síntomas de descortezamiento, se llevó a cabo la detección cuantitativa del CPsV, siguiendo el mismo protocolo de reacción que se utilizó para la construcción de las curvas estándares en un volumen de 20 µl. Se empleó como control positivo de la PCR una muestra de concentración conocida de RNA, como control negativo una muestra de un árbol sano y se manejó también un blanco.

160580

RESULTADOS

6.1 Evaluación de la calidad de los extractos de RNA

Los resultados que se obtuvieron de la evaluación de los métodos de extracción de RNA se muestran en la tabla VI. Como se puede apreciar la mejor relación de absorbancias ($A_{260nm/280nm}$) se obtuvo para los extractos obtenidos con purificación por cromatografía, seguida por la que se obtuvo con buffer GPS más PVP. Esto coincidió con los resultados obtenidos en la visualización de los extractos en geles de agarosa, ver figura 8.

Tabla VI

Resultados de la evaluación de los extractos por medio de espectofotometría

Unidades de medición	proteinasa K	TRIzol	celulosa	GPS+PVP	
				c/N_2	s/N_2
μg totales	86.42	12.87	90.97	79.07	27.37
μg/ml	1080.00	402.37	227.44	988.35	339.74
μg/g	345.7	128.75	128.75	316.00	109.51
$A_{260nm/280nm}$	0.67	1.58	1.90	1.12	1.66
var($A_{260/280}$)	0.01	0.04	0.06	0.33	0.01
μg utilizados	7.56	2.81	1.58	6.91	2.37
para RT ≅			4.94		
			1.97		

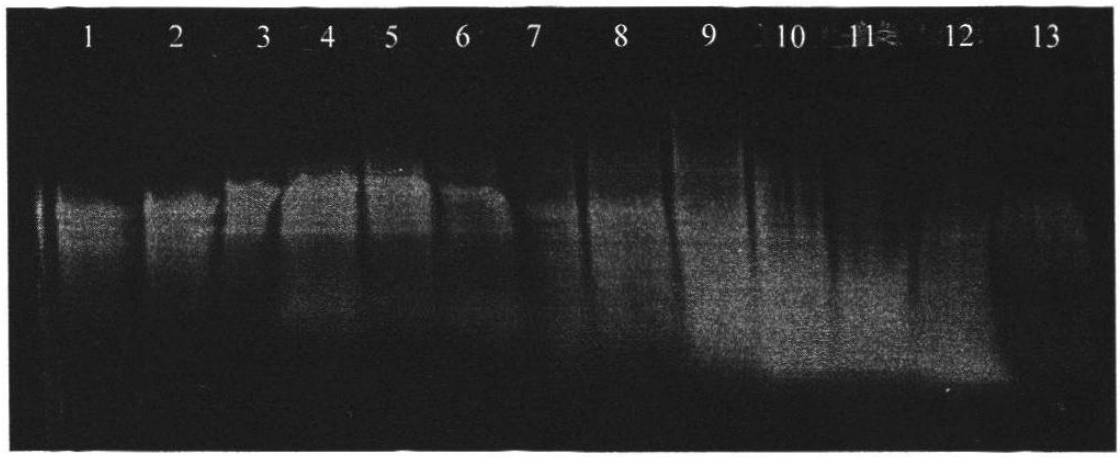


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de extractos de RNA. Carriles: 1, 2 y 3 obtenidos con celulosa; carriles: 4, 5 y 6: con GPS más PVP s/N_2; carriles: 7, 8 y 9: con GPS más PVP c/N_2; carriles: 10, 11 y 12 con TRIzol y carril: 13 obtenidos con proteinasa K.

6.2 Resultados de RT-PCR, protocolo de Barthe, *et al.*, 1998

Se logró la amplificación mediante RT-PCR (protocolo de Barthe, *et al.*, 1998) del fragmento de 600 pb del gen que codifica para la proteína de la cápside del CPsV cuando se utilizaron extractos de RNA obtenidos con los métodos de extracción en que se utilizó buffer GPS más PVP y TRIzol, cuatro por cada diez por los dos primeros métodos de extracción y tres por cada diez para el último (ver tabla VII).

Tabla VII

Resultados obtenidos en la detección del CPsV por RT-PCR

Árbol	Método									Relación +/total
	GPS + PVP c/N2			GPS + PVP s/N_2			TRIzol			
	Repetición									
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
GT01 2-15	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1/9
GT01 3-5	-	-	-	-	+	-	-	-	-	1/9
GT01 3-10	-	-	-	-	+	+	-	+	-	3/9
GT01 4-17	+	-	-	+	-	-	-	-	+	3/9
GT01 5-14	+	+	+	+	+	-	+	-	-	6/9
GT01 6-17	-	-	+	-	+	-	-	-	-	2/9
GT01 10-12	+	+	-	+	+	-	+	+	+	7/9
GT01 11-20	+	+	+	-	+	-	+	+	-	6/9
GT01 16-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0/9
GT01 16-14	-	-	-	+	+	-	+	-	-	3/9
CONTROL +	+	+	+	+	+	+	+	+	+	9/9

- RT-PCR negativo

+ RT-PCR positivo

6.3 Resultados de RT-PCR protocolo de Legarreta *et al.*, 2000

En las reacciones de RT-PCR siguiendo el protocolo descrito por Legarreta, *et al.*, 2000 se obtuvo amplificación inespecífica con los extractos obtenidos por todos los métodos. Se esperaba obtener amplificación de un fragmento de 192 pb y se amplificó un fragmento de 700 pb, ver figura 9.

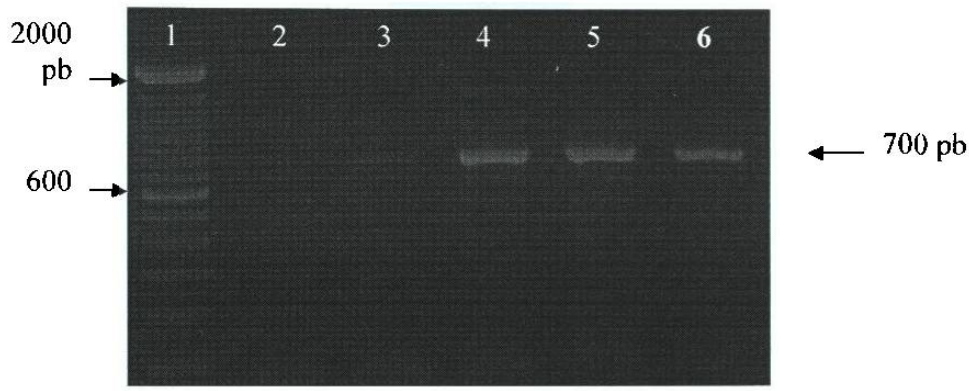


Figura 9. Electroforesis de productos de RT-PCR (protocolo de Legarreta, *et al.*,2000). Carril 1: Marcador de peso molecular (Invitrogen™); carril 2: control negativo de la RT-PCR (muestra sin RNA); carril 3: RT-PCR del extracto obtenido con celulosa; carril 4: RT-PCR de la extracción con proteinasa K; carril 5: RT-PCR de la extracción con GPS más PVP s/N_2 y carril 6: RT-PCR de la extracción con GPS más PVP s/N_2 de un árbol sano.

6.4 Obtención de un control positivo para RT-PCR tiempo real

Se logró amplificar el fragmento de 600 pb del gen de la proteína de la cápside del CPsV tanto a partir de la muestra de campo, como de invernadero. Los fragmentos se purificaron, por separado. El fragmento de la muestra de campo purificado se cuantificó y se utilizó como estándar de concentración (ver figura 10) en RT-PCR tiempo real. El fragmento obtenido a partir de la planta de invernadero se clonó en células competentes usando el vector TOPO PCR®4 y se confirmó la presencia del inserto en el plásmido mediante digestión enzimática, ver figura 11. En la transcripción del vector TOPO con el inserto se obtuvo el fragmento del tamaño esperado (RNA transcrito *in vitro*), 797 rNTP's, ver figura 12.

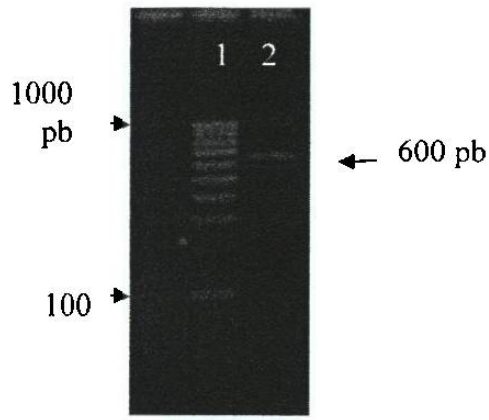


Figura 10. Electroforesis del estándar de concentración del fragmento de 600 pb de DNA del CPsV. Carril 1: marcador de peso molecular (Invitrogen™); carril 2: 90 ng de DNA.

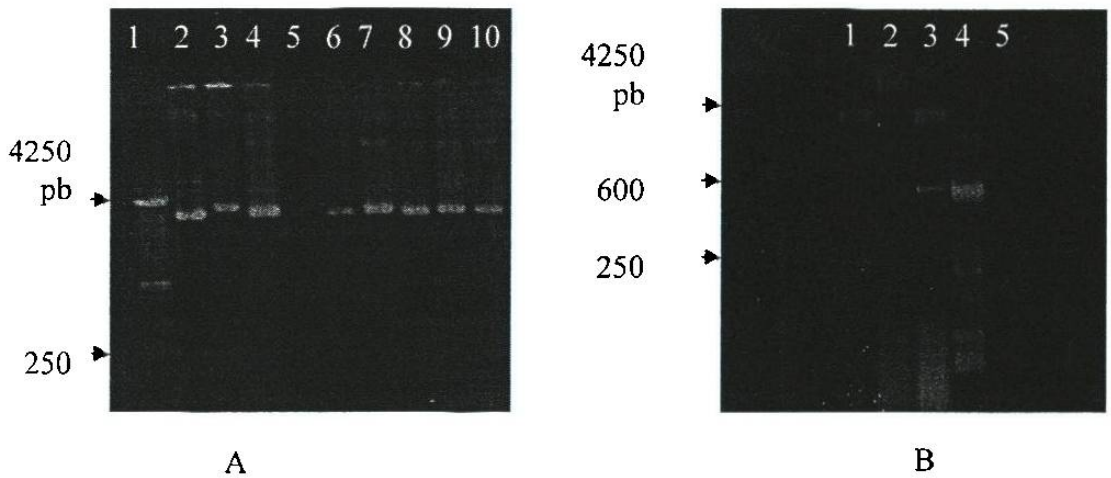


Figura 11. Electroforesis de DNA plásmido. Panel A. Carril 1: marcador de peso molecular (Invitrogen™); carriles del 2 al 10: DNA plásmido de cultivos de *E. coli* transformadas. Panel B. Carril 1: marcador de peso molecular (Invitrogen™); carril 2: DNA plásmido de la cepa recombinante seleccionada; carril 3: DNA plásmido digerido con *Eco* RI; carril 4: producto de PCR a partir de DNA plásmido con el inserto, carril 5: producto de PCR de a partir de RNA de la planta de invernadero infectada con el CPsV.

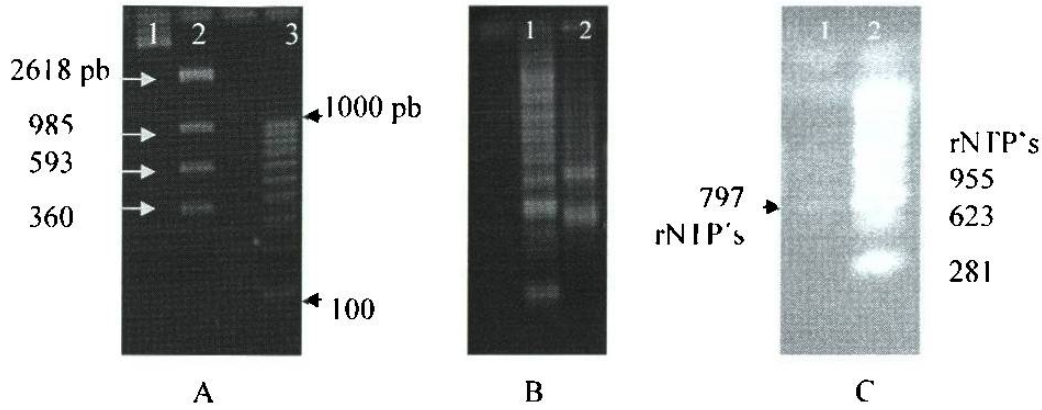


Figura 12. Electroforesis de DNA plásmido y del RNA transcrito *in vitro*. Panel A. Carril 1: DNA del plásmido con el inserto; carril 2: DNA del plásmido recombinante digerido con la enzima *Pvu* II; carril 3: marcador de peso molecular (Invitrogen™);. Panel B. Carril 1: marcador de peso molecular (Promega); carril 2: RNA transcrito *in vitro* en condiciones no desnaturalizantes. Panel C. Carril 1: RNA transcrito *in vitro* en condiciones desnaturalizantes; carril 2: marcador de peso molecular de RNA (Promega).

6.5 Secuencias de los fragmentos de 559 pb que corresponde al gen de la proteína de la cápside del CPsV

Las secuencias que se obtuvieron de los fragmentos de 559 pb a partir de la muestra de campo y de la planta de invernadero se muestran en la tabla VIII. Estas dos secuencias tienen un 98 % de similaridad, y coinciden en 547 de 559 bases, Las diferencias entre las dos secuencias están en las posiciones 28, 29, 30, 38, 39, 69, 120, 333, 334, 402, 495 y 507.

Tabla VIII

Secuencias de los fragmentos de 559 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV.

Muestra	Secuencia
NL	1 ACAAAAGGAAAGTACCTGAATTTGTCAATCGAAAGCTGCATGATGGTGA
PS	.....ATC.....TA.....
NL	50 TGTAAGTTTGTCACAAATCCGTGAGGAATTGAGTCATGCTCCAACAAAG
PS	.....A.....
NL	99 AAATTCCCTGCAAAGGTGTTTTTCAAGATTGATATAGACAACTTACCAA
PS	.....C.....
NL	148GTGCTGTTTGCTCTAGGTGTAAGCTGAATATTGCAGGTAATCGATCTGT
PS	.....
NL	197GAGATATGCTGGGTTTGCGAGCAGTTTTCAAACCAAGCAAAAGTTGTCC
PS	.....
NL	246CCTGCTGTTGGTGCAACTCCTGAATCCCTGATGCCATTGCTGGAAACCA
PS	.....
NL	295ATCAAAAGATTGAAAAATCAATTGCAATAAGAGATTTTCTGAAAACAAT
PS	.....TC.....
NL	344GGAGGGACAATGGAAGAATCAGAAAAGGCTTCATCCTTTATCTGATGAA
PS	.....
NL	393AAACCAACAATAAAAAACTTCACTCTGAAGTTGACATGTGCCATAATTT
PS	.....T.....
NL	442ACAGCCTCACTCCAGATGGCAGAATTGACATGGCCGAGAGGATAATAAC
PS	.....
NL	491CGACGAGAACAAGGGGGTTCAGAATGATAGAAACTTCTTTGGCGATGGT
PS	....A.....T.....
NL	540GAAGGGCCAACTAGGACATG
PS	.....

NL muestra de campo obtenida de un árbol en una huerta ubicada en General Terán, NL.

PS muestra de una planta de invernadero inoculada con el CPsV

6.6 Evaluación de la sonda Taqman y los iniciadores para RT-PCR tiempo real diseñados con base en la secuencia AFO36338 reportada en el banco de genes

Se obtuvo una eficiencia muy baja de amplificación en la RT-PCR tiempo real con la sonda Taqman y los iniciadores diseñados con base en la secuencia AFO36338. En

estos experimentos se obtuvieron valores de C_T mayores a 35, la correlación entre la cantidad de DNA o RNA molde con respecto a los valores de C_T fue nula.

6.7 Evaluación de la sonda Taqman y los iniciadores para RT-PCR tiempo real diseñados con base en la secuencia obtenida de 559 bases del gen de la proteína de la cápside del CPsV

En la evaluación que se realizó de los iniciadores y la sonda Taqman para RT-PCR tiempo real diseñados con base en la secuencia obtenida de la muestra de campo, utilizando combinaciones de concentración de estos reactivos se obtuvieron los valores de C_T que se muestran en la figura 13 y en la tabla IX. La curva de amplificación de los blancos también cruzó la línea base. Se obtuvieron valores muy similares de C_T para la misma muestra con las diferentes combinaciones de concentración evaluadas y para el caso de los blancos el valor del C_T tuvo diferentes valores.

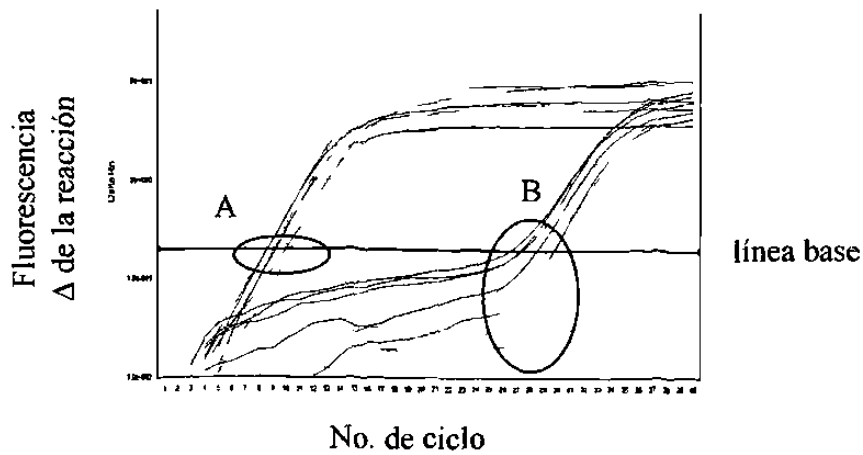


Figura 13. Gráfico de la evaluación de la sonda y los iniciadores a concentraciones diferentes. A: C_T's para la muestra de DNA del CPsV; B: C_T's para los blancos.

Tabla IX

Valores de C_T obtenidos con una misma concentración de DNA y combinaciones de concentraciones diferentes de sonda Taqman e iniciadores

Combinación	Sonda Taqman (μM)	Iniciadores (μM)	C_T muestra	C_T blanco
1	0.25	0.50	13.32	29.12
2	0.25	0.25	13.34	28.63
3	0.25	0.15	13.75	28.68
4	0.15	0.50	13.41	30.03
5	0.15	0.25	13.35	29.20
6	0.15	0.15	13.28	29.03
7	0.10	0.50	13.60	30.03
8	0.10	0.25	13.37	-
9	0.10	0.15	13.74	-

- No se obtuvo valor de CT

6.8 Curvas estándar para RT-PCR tiempo real

Se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) de 0.98 en la curva estándar con las muestras de DNA, del fragmento de 600 pb purificado y cuantificado por espectofotometría, cuando se trabajó con un volumen de reacción de 10 µl. Cuando se trabajó con un volumen de reacción de 20 µl, se obtuvo un r^2 de 0.998 y un porcentaje de eficiencia del 94.5%. Los datos obtenidos de la curva de calibración se muestran en la tabla X. En la figura 12 se pueden apreciar las gráficas de este experimento.

Tabla X

Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de DNA

Cantidad de DNA (ng)	Número de copias	C_T	Cantidad calculada (ng)
1.5×10^{0}	4.96×10^{10}	10.27	1.60×10^{0}
1.5×10^{-1}	4.96×10^{9}	14.08	1.52×10^{-1}
1.5×10^{-2}	4.96×10^{8}	17.70	1.36×10^{-2}
1.5×10^{-3}	4.96×10^{7}	21.22	1.39×10^{-3}
1.5×10^{-4}	4.96×10^{6}	24.62	1.09×10^{-4}
1.5×10^{-5}	4.96×10^{5}	28.21	1.28×10^{-5}
1.5×10^{-6}	4.96×10^{4}	30.80	1.80×10^{-6}

Nota: volumen de reacción: 20 µl, concentración de la sonda Taqman: 0.15 µM y de los iniciadores: 0.25 µM

Cuando se realizó RT-PCR tiempo real se obtuvo un r^2 de 0.998 para la curva de calibración y un porcentaje de eficiencia de 94.1% cuando se realizó el ensayo de RT-PCR con muestras de concentración conocida de RNA transcrito *in vitro* (cuantificado por fluorometría), el volumen de reacción para este caso también fue de 20 µl. Los datos obtenidos en este experimento se muestran en la tabla XI y en la figura 14.

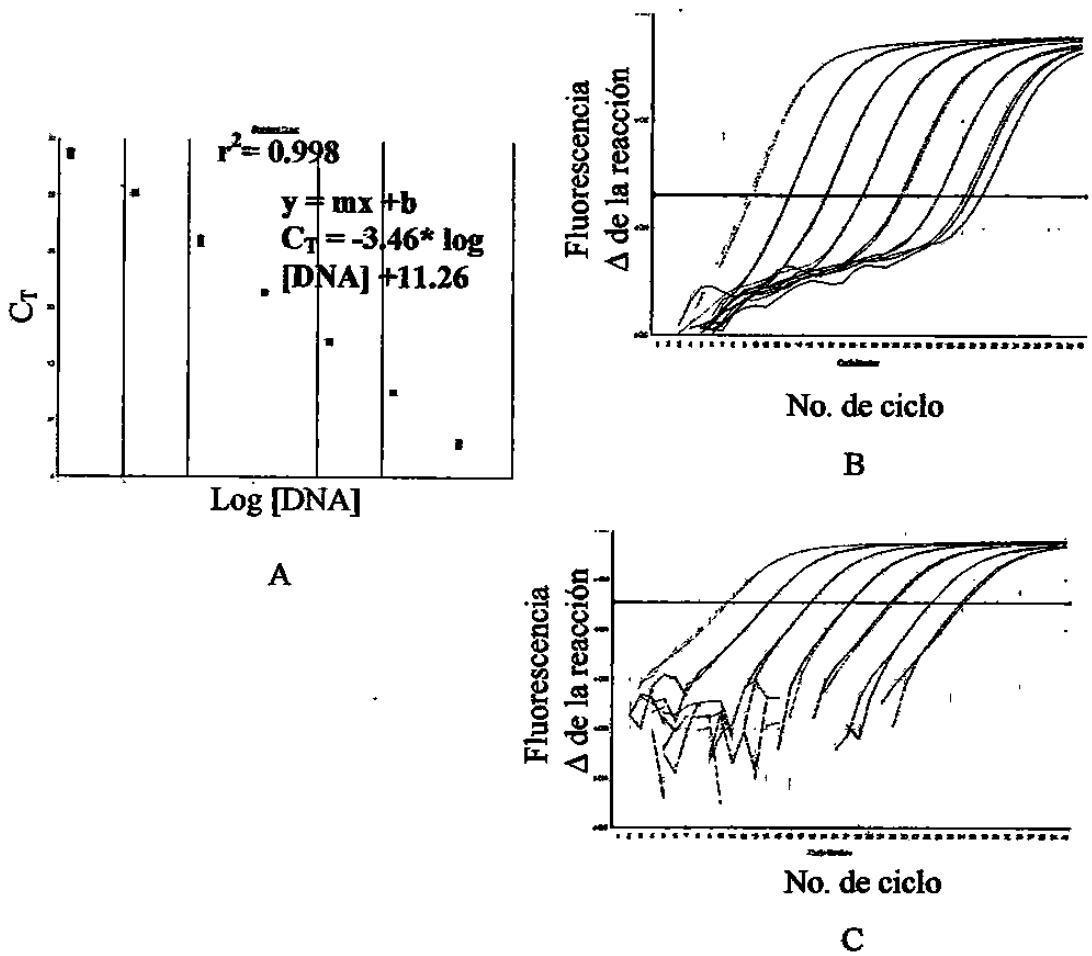


Figura 14. Curva estándar de PCR tiempo real que se obtuvo con concentraciones diferentes de DNA. Panel A. Curva estándar. Panel B y C gráficos de amplificación.

Tabla XI

Valores obtenidos de la curva estándar utilizando concentraciones diferentes de RNA,

Cantidad de RNA (ng)	Número de copias	C_T	Cantidad Calculada (ng)
5×10^{-2}	1.24×10^{8}	7.39	5.50×10^{-2}
5×10^{-3}	1.24×10^{7}	10.84	5.60×10^{-3}
5×10^{-4}	1.24×10^{6}	14.70	4.34×10^{-4}
5×10^{-5}	1.24×10^{5}	18.24	4.20×10^{-5}
5×10^{-6}	1.24×10^{4}	21.48	4.80×10^{-6}
$5 \times 10^{-7*}$	1.24×10^{3}	25.90	2.57×10^{-7}

* este punto se eliminó para obtener la ecuación de la curva estándar

Nota: volumen de reacción: 20 µl, concentración de la sonda Taqman: 0.15 µM y de los iniciadores: 0.25 µM.

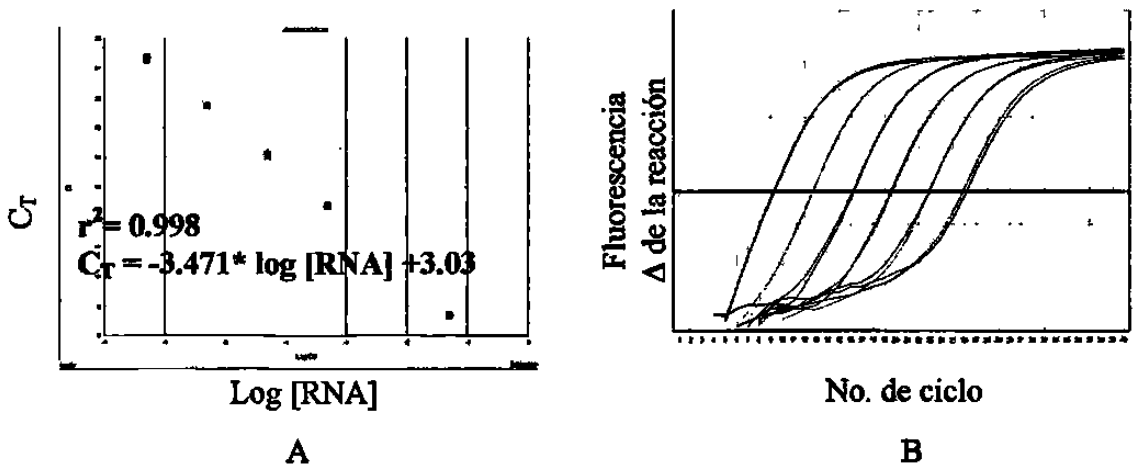


Figura 15. Curva estándar de RT-PCR tiempo real que se obtuvo con concentraciones diferentes de RNA. Volumen de reacción de 20 µl, concentración de la sonda Taqman de 0.15 µM y de los iniciadores 0.25 µM. Panel A: curva estándar. Panel B: gráfico de amplificación.

6.9 Detección cuantitativa del CPsV mediante RT-PCR tiempo real en muestras de campo

En la detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo se logró detectar el virus en 4 de los diez arboles evaluados. En la tabla XII se muestran los valores de C_T obtenidos para cada muestra. Se obtuvieron valores de carga viral para cada una de las muestras positivas tanto de las muestras de campo como de la planta de invernadero (tabla XIII).

Tabla XII

Valores de C_T obtenidos en cada repetición de detección cuantitativa del CPsV

Árbol	C_T		
	Repetición		
	1	2	3
GT01 2-15*	20.22	22.17	24.00
GT01 3-5	28.95	27.96	27.56
GT01 3-10	28.34	28.28	-
GT01 4-17*	22.81	18.20	22.85
GT01 5-14	28.86	28.03	36.00
GT01 6-14	29.12	29.65	28.55
GT01 10-12	28.02	28.55	28.78
GT01 11-20	27.39	27.29	26.26
GT01 16-11*	22.22	26.51	23.42
GT01 16-14*	22.09	29.10	22.00
Planta de invernadero*	21.70	21.78	20.54
Árbol sano	27.25	27.52	27.21
Blanco	30.13	28.18	-

* detección positiva del CPsV

Tabla XIII

Número de copias del CPsV detectadas en 9 µl de RNA obtenidos de muestras de tejido infectado

Árbol	Número de copias			$\bar{X}$
	Repetición			
	1	2	3	
2-15	2.79×10^4	7.6×10^3	2.20×10^4	1.92×10^4
4-17	4.98×10^4	1.06×10^5	4.86×10^3	5.35×10^4
16-11	7.40×10^3	4.23×10^2	3.30×10^3	3.70×10^3
16-14	7.88×10^3	No se detectó	8.52×10^3	8.20×10^3
Planta de invernadero	1.04×10^4	9.89×10^3	2.25×10^4	1.42×10^4

Los valores de C_T obtenidos para muestras de arboles aledaños a los árboles con síntomas fueron muy cercanos a los obtenidos para el árbol sano y el blanco, ver tabla XIV.

Tabla XIV

Valores de C_T obtenidos para árboles sin síntomas

Árbol sin síntomas aledaño a un árbol infectado GT01	C_T
2-14	26.46
3-4	-
3-9	25.78
4-16	32.70
5-13	27.72
6-16	25.98
10-11	28.33
11-19	34.81

DISCUSIÓN

7.1 Evaluación de métodos de extracción para la detección del CPsV por RT-PCR

La mejor relación de $A_{260nm/280nm}$ de 1.9 se obtuvo con los extractos obtenidos con celulosa y está en el rango de 1.8-2.0 en el que se considera que los extractos son sólo ácidos nucleicos. Esta relación de absorbancias es un indicador de que se pudieron retirar de los extractos, péptidos y solventes que se utilizan en los procedimientos de extracción. Sin embargo, por tal procedimiento de extracción-purificación de RNA no se recuperó RNA del virus, ni aún para el caso del control positivo, a diferencia de lo reportado por Almeyda, *et al.* (2003) en la detección de viroides. Las razones probables son que la naturaleza de los ácidos nucleicos se afectó al unirse temporalmente a la celulosa o que el RNA viral se perdió en algunos de los pasos del procedimiento de extracción-purificación que por ser RNA de cadena simple es más propenso a degradarse.

Cuando los extractos se obtuvieron con buffer GPS más PVP c/N_2 la relación de absorbancias fue de 1.12 y mejoró a 1.67 cuando se maceró el tejido con el buffer, lo que probablemente se debe a que pulverizar los tejidos con nitrógeno perjudica la calidad de los extractos (Legarreta, *et al.*, 2000). La relación de absorbancias para los extractos obtenidos con proteinasa K es la que está más alejada del intervalo 1.8-2. En la visualización de los extractos en geles de agarosa (figura 8), se pudo apreciar que hay menos degradación del RNA ribosomal en los extractos obtenidos con buffer GPS más PVP que los obtenidos con TRIzol, esto puede resultar de interés cuando se pretende trabajar con RNA ribosomal. La degradación del RNA ribosomal en extracciones con TRIzol se menciona en el reporte de extracción de RNA de plantas por Zhang *et al.*, 2006.

En las reacción de RT-PCR, sólo se obtuvo amplificación del fragmento de 600 pb esperado a partir de extractos obtenidos con buffer GPS más PVP y TRIzol (tabla VII). Hay trabajos en los que se reporta la obtención de DNA del CPsV utilizando proteinasa K (Derrick *et al.*, 1988 y García *et al.*, 1991) cabe mencionar que en esos casos se lleva a cabo un procedimiento de purificación adicional y se utilizan cantidades de más de 4 g de tejido, contrario a los reportes anteriores, Legarreta *et al.* (2000) reportaron problemas en la detección del virus mediante la técnica de RT-PCR cuando hicieron extracciones simples utilizando proteinasa K y maceraron el tejido con nitrógeno líquido.

En este trabajo se considera que el grado de pureza de los extractos no fue determinante para la amplificación de fragmentos de DNA del CPsV al igual que en la investigación realizada por Hosaka (2004) quien desarrolló un método rápido de extracción de ácidos nucleicos en papa. Las características comunes de los procedimientos por los cuales se obtuvo amplificación específica son, que son métodos más simples y rápidos y que de alguna manera se evita la formación de óxidos de fenol y por lo tanto la formación de inhibidores de la RT-PCR, tal como se recomienda para extracción de ácidos nucleicos de plantas verdes tanto para la detección de virus y viroides (Logeman, et al., 1987; Kim, *et al.*, 1997; Scopes, *et al.*, 1994, Nakahara, *et al.*, 1999; Camacho, *et al.*, 2004; Bernard, *et al.*, 2006; Britic, *et al.*, 2006).

En la detección del CPsV por RT-PCR por el protocolo de Barthe, *et al.*, 1998, a partir de los extractos obtenidos con amortiguador GPS más PVP y con TRIzol, el número de reacciones positivas para cada árbol fue diferente para cada caso. Así para el árbol GT01 3-10 se obtuvieron 3 positivas de las 9 efectuadas, para el árbol GT01 11-20 se obtuvieron 6 positivas de las 9 realizadas. A diferencia de las muestras de los árboles infectados para el caso del control positivo en que se utilizaron extractos de hojas de una planta de invernadero se obtuvieron 9 reacciones positivas de 9. El número de reacciones positivas obtenidas para cada árbol probablemente dependió de la aleatoriedad con la cual se tomaron las muestras de hojas de diferentes ramas en un árbol, entre otros posibles factores. Para el control positivo la consistencia en la

detección del virus probablemente se debe a que las muestras son hojas frescas de una planta de invernadero que se encuentra a temperatura constante y la carga viral en éstas es más alta, tal como se sugiere en lo reportado en la detección del CPsV por serología (Martín, *et al.*, 2002).

Por medio del protocolo de RT-PCR de Legarreta, *et al*, (2000) la amplificación obtenida fue inespecífica, problema que es descrito por ellos mismos en el artículo que publicaron. Si bien por este experimento no se logró detectar el virus, si permite darse cuenta que por todos los procedimientos se obtuvo RNA genómico que se puede amplificar, sin embargo se puede observar que la banda del carril 3 de la figura 9 que corresponde al producto obtenido a partir de los extractos por cromatografía es más tenue, de aquí la suposición que la naturaleza del RNA se pudo haber alterado en el procedimiento de purificación y esto tal vez tenga efecto en la RT-PCR.

7.2 Implementación de un protocolo de RT-PCR tiempo real

Como se describe en el apartado de resultados, en la implementación del protocolo de RT-PCR tiempo real, se logró amplificar el fragmento de 600 pb a partir de una muestra de campo y de la planta de invernadero por medio del protocolo de RT-PCR en un solo paso, este protocolo fue modificado a partir del propuesto por Barthe, *et al.*, (1998) y ofrece la ventaja de ser un procedimiento más práctico por que implica menos manipulación de los reactivos y ser un procedimiento más rápido.

La estrategia que se siguió para la purificación del fragmento de 600 pb funcionó, en la medida que se pudo cuantificar por espectofometría la cantidad de DNA presente en los productos purificados (la relación de $A_{260nm/280nm}$ de estos productos fue de 2), y de igual manera el fragmento purificado se clonó en el vector TOPO y se obtuvo una cepa con el plásmido recombinante. Así mismo, la estrategía de transcripción del fragmento híbrido de 797 rNTP´s se logró, fue posible cuantificar por fluorometría una cantidad de RNA de longitud conocida no así por espectofotometría, dado que la relación de absorbancia estuvo fuera del rango de 1.8-2. Estas estrategias de obtención

de estándares de concentración de DNA y RNA de virus como controles de cuantificación para RT-PCR tiempo real ha sido implementada por otros investigadores con resultados satisfactorios, al igual que en este caso (Laue T, *et al.*, 1999; Tang-Nelson, *et al.*, 2001).

La poca eficiencia de amplificación que se logró con el diseño de la sonda Taqman e iniciadores con base en la secuencia AFO36338 reportada en el banco de genes, probablemente se debió a que hay diferencias en la secuencia del fragmento que se pretendió amplificar de la muestra de campo con la que corresponde a la secuencia AFO36338, ver tabla XV.

Tabla XV

Comparación de la secuencia de 70 bases de la muestra de campo que se pretendía amplificar, con su correspondiente en la secuencia AFO36338

Muestra		Secuencia
NL	1	ACAACTTACCAAGTGCTGTTTGCTCTAGGTGTA
AFO36338		.T.....G.....C..A..CA
NL	34	AGCTGAATATTGCAGGTAATCGATCTGTGAGATATGC
AFO36338		.A.....T..A.....G.....

NL: Secuencia obtenida a partir de una muestra de un árbol en huerta ubicada en General Terán, NL

AFO36338: Secuencia reportada en el banco genes

Por otra parte el análisis BLAST de las secuencias de 559 bases obtenidas, reveló que estás secuencias tienen una mayor similitud con las secuencias reportadas por Alioto, *et al.*, 2003; Loconsole, *et al.*, 2006; Martin, *et al.*, 2005; y una menor similaridad con las reportadas por Sanchéz, *et al.*, 1999 y Barthe, *et al.*, 1998, (ver tabla XVI). Lo que probablemente se debe a que las secuencias se obtuvieron de RNA viral a

partir de arboles que muestran el síntoma de descortezamiento en tronco y manchas en hojas jóvenes, al igual que las descritas por Alioto, et al., (1999 and 2003) con base en lo anterior se puede considerar que los arboles evaluados están afectados por Psorosis A, si se atiende a la clasificación que hacían Fawcett y Klotz (citados en Roistacher, 1993). En estos árboles no se observan manchas en forma de anillos en frutos como es el caso de las plantas de las cuales obtuvieron RNA viral Barthe, *et al.*, 1998.

Tabla XVI

Similaridad de las secuencias obtenidas de los fragmentos de 559 bases con otras reportadas en el banco de genes

No. de acceso	Autores	% de similaridad
AY194900-AY194918	Alioto, *et al.*, 2003	97-96
AY194881-AY194899	Alioto, *et al.*, 2003	97-96
AM159538	Loconsole, *et al.*, 2006	97
AY654894	Martín, *et al.*, 2005	96
AFO36926	Barthe, *et al.*, 1998	93
AFO36338	Barthe, *et al.*, 1998	85
AFO60855	Sánchez, *et al.*, 1999	85

Como se explica en el apartado de resultados el diseño de la sonda Taqman e iniciadores con base en la secuencia obtenida de la muestra de campo, funcionó adecuadamente, los coeficientes de correlación entre concentración de DNA o RNA molde con respecto a los valores de C_T fueron de 0.998 (con volúmenes de reacción de 20 µl) lo que indica un manejo apropiado de las muestras estándares y un buen ejercicio de pipeteo al preparar las mezclas de los reactivos; los valores de eficiencia obtenidos (94.5 y 94.1) indican que la concentración de iniciadores y sonda Taqman utilizados, así como la sensibilidad de los mismos en la detección del CPsV fueron buenos. Estos parámetros de evaluación son descritos en los manuales de equipos de proveedores de

equipo y reactivos para PCR tiempo real (como Applied Biosystem y BIORAD). La secuencia del fragmento que se amplifica por medio de RT-PCR tiempo real de la muestra de campo es idéntica a la que se amplifica de la planta de invernadero. Resultados de un análisis BLAST de esta secuencia de 79 bases, en el Centro Nacional para Información de Biotecnología (siglas en ingles NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), muestran que es una secuencia conservada en cinco de las secuencias que se reportan en el banco de genes, tiene una diferencia de una base para 9 de las reportadas, de dos para seis aislamientos y de más de cinco para tres de las secuencias que se reportan del CPsV ver apéndice D. De tal manera que es muy probable que este conjunto de iniciadores y sonda Taqman den resultados similares en la detección del CPsV con otros aislamientos a los obtenidos en esta investigación.

En la evaluación de diferentes concentraciones de sonda Taqman e iniciadores, así como en los ejercicios de calibración y detección cuantitativa del CPsV, se obtuvieron valores de C_T para las muestras de un árbol sano y los blancos. Estos valores fueron similares a los que se obtuvieron para algunas muestras de arboles con síntomas, por lo que se consideró que para estos arboles con síntomas no se logró detectar el virus. En la curva de calibración de RNA los datos de las dos muestras estándares más diluídas se tuvieron que eliminar, debido a que el valor de r^2 disminuye a 0.98, lo que implicaría un error mayor en el cálculo para la detección cuantitativa del CPsV, el rango dinámico con la cual se obtuvo la ecuación de la curva estándar obtenida con RNA transcrito *in vitro* fue de 1.24×10^8 a 1.24×10^4. Si se compara este rango dinámico con los que se manejan en algunos reportes en la literatura, tenemos que en la detección cuantitativa del virus varicela-zoster (Furuta *et al.*, 2001) por medio de RT-PCR tiempo real, reportan que obtienen linealidad en la curva estándar en un rango de 10 a 10^5 copias, sin embargo los coeficientes de correlación que obtienen son > 0.96; en la detección del virus del dengue reportan que al trabajar con un rango dinámico de 10^3 a 10^7 obtienen un coeficiente de correlación de 0.98 (Laue *et al.*, 1999); Martell *et al.*, 1999 manejan un rango dinámico de 10^3 a 10^7 y obtienen un r^2 de 0.98 y Niesters *et al.*, 2000 en el rango dinámico de 10^2 a 10^7 obtienen una r^2 de 0.98.

Debido a que aparentemente se tiene amplificación en muestras de arboles sanos, en blancos y a la poca correlación que hay del C_T con la concentración de RNA con muestras estándares más diluídas, consideramos que el protocolo de RT-PCR tiempo real falla en detectar concentraciones pequeñas de RNA del CPsV. Esta deficiencia puede atribuirse ya sea a problemas de contaminación, a que durante la reacción se produce un artificio en la mezcla de reacción que da como resultado falsos positivos y/o a la dificultad para asegurar una concentración baja en muestras estándares (de 10^0 a 10^2 copias). Para evitar el problema de la contaminación se dividieron los *stocks* de iniciadores, sonda Taqman y Mix Master en alícuotas, y en el experimento de la detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo, se trabajó con una alícuota de un kit de reactivos para RT-PCR tiempo real nuevo, así como con puntillas con filtro. En el reporte de Tang-Nelson, *et al*, 2001 se hace mención que para muestras sin DNA o RNA blanco también obtienen valores de C_T, lo que apoya la teoría de que la aparente amplificación a partir de muestras del árbol sano y de los blancos se deba a que se produce un artificio en la mezcla de reacción que emite determinada fluorescencia y da como resultado falsos positivos. Por lo que se recomienda descartar la amplificación en aquellas muestras en que el C_T sea cercano al obtenido para los blancos o muestras sin RNA molde.

Dado que la detección del CPsV fue consistente en la planta de invernadero tanto por RT-PCR convencional como por RT-PCR tiempo real se pueden considerar que ambos son procedimientos confiables en la detección del CPsV en plantas que están en invernadero, como lo son los lotes de material de propagación de cítricos. Sin embargo se tiene que asegurar el procedimiento de extracción de ácidos nucleicos y de RT-PCR, trabajando con controles positivos (muestras plantas de invernadero inoculadas con el CPsV), controles negativos (muestras de árboles sanos), así como blancos de la reacción para descartar problemas de contaminación. Esto puede ser de interés si se quiere certificar material de propagación de cítricos.

El empleo de RT-PCR tiempo real en la detección cuantitativa del CPsV abre una posibilidad de estudio de la psorosis, en la determinación de carga viral en arboles

afectados en campo, en determinaciones de carga viral en las cuatro épocas del año, en diferentes tipos de tejidos de los arboles (corteza, madera, varetas, frutos, etc.) y variedades de cítricos.

CONCLUSIONES

En las evaluaciones de la calidad de los extractos, la mejor relación de $A_{260nm/280nm}$ se obtuvo para los extractos obtenidos con purificación por cromatografía, seguida por la que se obtuvo para los extractos obtenidos con buffer GPS más PVP cuando se maceraron los tejidos con el buffer.

En las reacciones de RT-PCR convencional solamente se obtuvieron amplificaciones específicas cuando se utilizaron los extractos obtenidos con buffer GPS más PVP y con TRIzol.

Con la sonda Taqman e iniciadores diseñados a partir de la secuencia AFO36338 en el banco de genes se obtuvo una eficiencia muy baja en la amplificación de DNA por RT-PCR tiempo real; la correlación entre los valores de C_T's y concentración de DNA del CPsV fue nula.

Con el diseño de sonda Taqman e iniciadores con base en la secuencia obtenida de una muestra de campo, se obtuvieron resultados satisfactorios.

En la construcción de la curva de calibración cuando se trabajó con un volumen de reacción de 10 µl y concentración de sonda de 100 nM e iniciadores 150 nM, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.98.

Cuando se trabajó con un volumen de reacción de 20 µl, y concentración de sonda Taqman de 150 nM y de iniciadores de 250 nM, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.998 y una eficiencia de 94.5% en la construcción de la curva de calibración.

Se obtuvieron dos secuencias de fragmentos de 559 bases que corresponden al gen de la proteína de la cápside del CPsV, una a partir de una muestra de planta de invernadero y otra de una muestra de campo. Las dos tienen mayor similaridad con las reportadas para aislamientos de Italia.

Las secuencias de los fragmentos que se amplifican en RT-PCR tiempo real del fragmento de la muestra de invernadero que se clonó y el fragmento purificado a partir de la muestra de campo, son idénticas.

Los protocolos de RT-PCR convencional y RT-PCR tiempo real evaluados son 100% confiables en la detección del CPsV en muestras de plantas de invernadero, en muestras de campo se obtuvo un 40% de sensibilidad en la detección.

Se determinó carga viral del CPsV en muestras de tejido infectado.

PERSPECTIVAS

La implementación del protocolo de RT-PCR tiempo real se evaluó con tejidos infectados de una planta de invernadero y muestras de campo ubicados en el municipio de General Terán; Nuevo León, una perspectiva de este trabajo es evaluar este protocolo con muestras de árboles afectados por la psorosis en otras regiones citrícolas.

La metodología de RT-PCR tiempo real es una metodología que permite conocer la interacción del huésped y un patógeno, en este caso el CPsV, una recomendación de este trabajo es el estudio de la carga viral en diferentes tejidos de árboles afectados por la psorosis, tales como corteza, vareta, frutos, madera, yemas, etc.; en diferentes épocas del año y en diferentes variedades de cítricos, como alternativa para conocer más sobre el comportamiento del virus.

En este trabajo se obtuvieron dos secuencias de 559 bases que corresponden a un fragmento del gen de la proteína de la cápside del CPsV, el genoma completo del virus para aislamientos de México no esta caracterizado y representa también una posibilidad de estudio.

LITERATURA CITADA

Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, Tanaka S, Yoshiba M, Kohara M. 1999. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real-time detection PCR. J. Clin. Microbiol. 37: 2899-2903.

Alioto D, Gangemi M, Deaglio S, Sposato P, Noris E, Luisoni E, Milne RG. 1999. Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. Plant Pathology. 48:735-741.

Alioto D, Malfinato M, Troisi A, Peluso A, Martín S, Milne RG, Guerri J, Moreno P. 2003. Variability of the coat protein gene of citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. Arch Virol, 148(11): 2155-66.

Almeyda LH, Iracheta CM, Orona CF, Kahlke CJ, Rocha PM. 2003. Extracción simple de ácidos nucleicos para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR. Revista Mexicana de Fitopatología. 21:364-369.

Applied Biosystem. Manual de procedimientos y operación del equipo 7300 Real Time PCR System.

Applied Biosystem. Primers Express™ 2.0.

Arroyo L. 1984. Elimination of citrus ringspot virus by shoot-tip grafting. 9ª. Conferencia de IOCV, Riverside. 177-179.