

L. INTRODUCCION

Los cítricos representan el grupo de frutales con mayor superficie cultivada en México. En 1995 fueron reportadas 422,000 ha sembradas con naranja y limón, cifra superada únicamente por el café y la caña de azúcar (INEGI, 1995). En la citricultura de México predomina el naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) como portainjerto. Las plantas injertadas sobre éste, por una parte son altamente susceptibles al virus de la tristeza de los cítricos (VTC), y por la otra son asintomáticas a infecciones tanto por exocortis como por cachexia, propiciando una situación irreal en la sanidad de las plantaciones. En un muestreo realizado en Nuevo León, se determinó que uno de cada dos árboles (56%) está infectado por el viroide que causa la enfermedad exocortis (Sánchez-Salas, 1980) y una situación similar parece ocurrir en Tamaulipas (Robles Serna, 1985). Con relación a cachexia, aunque se desconoce su ocurrencia en México, es muy probable que esté presente, pero el uso generalizado del naranjo agrio oculta su presencia (Rocha-Peña y cols., 1995).

La ausencia de síntomas por exocortis en las plantaciones de cítricos ha ocasionado que su importancia haya sido subestimada durante algún tiempo por los citricultores y personas relacionadas con este cultivo; sin embargo, la prevalencia de esta enfermedad en forma asintomática constituye un riesgo y limita el empleo de otros portainjertos como alternativa al naranjo agrio de uso actual, los cuales son susceptibles a viroides. En México, debido a las detecciones del VTC efectuadas en varios estados de país en los últimos años, desde 1993 existe la tendencia de una gran cantidad de citricultores, de sustitución del naranjo agrio como portainjerto en el establecimiento de nuevas plantaciones. Los patrones tolerantes al VTC más utilizados son los citrangeres Carrizo y Troyer, y el citrumelo Swingle, los cuales son susceptibles a exocortis; asimismo, también existe cierta tendencia para utilizar el mandarino Cleopatra, el cual existen reportes de su susceptibilidad a cachexia (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992).

El método utilizado en el pasado en México para la detección de viroides fue mediante bioensayos en plantas indicadoras, cidra Etrog para exocortis, y mandarino Parson's Special para cachexia (Sánchez-Salas, 1980); sin embargo, este método de detección tiene algunos inconvenientes: i) Requiere grandes espacios en los invernaderos; ii) Requiere un estricto control de temperatura de los mismos; iii) Es lento en mostrar la reacción (de 3 a 6 meses para exocortis y de 12 a 18 meses para cachexia) , adicionalmente razas débiles del patógeno pueden pasar desapercibidas

por la ausencia de síntomas acentuados (Roistacher, 1991). Ante esta problemática surge la necesidad de contar con métodos de detección rápidos y altamente sensibles para determinar la sanidad de los árboles principalmente en lotes donadores de yemas, ya que de no efectuarse lo anterior se corre el riesgo de propagar yemas infectadas por viroides con el consiguiente deterioro de las futuras plantaciones y escaso rendimiento del cultivo.

1.1 Hipótesis

Es posible utilizar las técnicas moleculares electroforesis secuencial y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa para la detección rápida, precisa y sensible de los viroides exocortis y cachexia de los cítricos.

Existen diferencias en la selectividad del RNA viroidal dependiendo del método de extracción utilizado.

1.2 Objetivos

- i) Implementación de la técnica electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) para la detección directa de viroides.**
- ii) Comparación de 5 métodos de extracción del RNA para la detección de viroides en cítricos.**
- iii) Establecimiento y optimización del método de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para amplificar el DNA complementario (cDNA) al RNA viroidal causante de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos.**
- iv) Validación de las técnicas sPAGE y RT-PCR en plantas con infección natural de campo.**

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Identidad de los viroides

Los viroides son los patógenos más pequeños conocidos en la actualidad; fueron descubiertos en 1971 por Theodor Diener y son moléculas de RNA con 246-372 nucleótidos de longitud (excepto uno que tiene 463), de cadena sencilla de bajo peso molecular, cerrados covalentemente, con una estructura secundaria circular que les permite adoptar configuraciones de tipo doble cadena. Algunas otras propiedades conocidas son su replicación autónoma al ser introducidos artificialmente en diferentes especies vegetales causando la aparición de síndromes (Diener, 1979; Martínez-Soriano, 1992; Riesner y Gross, 1985).

2.2 Ocurrencia, distribución e importancia en la agricultura

Desde su descubrimiento en 1971, día con día se ha reportado la ocurrencia de nuevos viroides así como formas o variantes de éstos, en diferentes especies vegetales, de tal manera, que actualmente se conocen 28 viroides y 207 variantes de ellos (Lafontaine y cols., 1998; Catálogo de viroides ver internet <http://www.callisto.si.usherb.ca/~jpperra>; GenBank versión 105.0+, abril 1998, ver <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Haciendo una cronología del descubrimiento de los viroides, en el Cuadro 1 se resalta su aumento uniforme en número a través del tiempo, con 8 viroides descubiertos durante la primer década (1971-1980), 8 en la segunda (1981-1990), y 12 en la tercera, aunque esta última aún no termina por lo que se espera que supere aún más a las anteriores. Cabe destacar que no hay un criterio divisorio definitivo entre un viroide y una variante, lo cual ha ocasionado confusión en algunos casos, un ejemplo claro de esto lo constituyen los viroides enanismo del lúpulo (hop stunt viroid=HSVd), cachexia de los cítricos (citrus cachexia viroid=CCaVd) y fruto pálido del pepino (cucumber pale fruit viroid=CPFVd), los cuales podrían ser viroides distintos ya que se hospedan en especies diferentes y causan síndromes distintos; sin embargo, con base en su secuencia nucleotídica, los tres comparten más de un 95% de homología, por lo cual se podrían considerar como variantes de un mismo viroide (Shikata, 1990).

Cuadro 1. Descubrimiento cronológico de viroides.

Viroide/enfermedad	Abreviatura	Referencia
Tubérculo fusiforme de la papa	PSTVd	Diener (1971)
Exocortis de los cítricos	CEVd	Semancik y Weathers (1972)
Enanismo del crisantemo	CSVd	Diener y Lawson (1973)
Fruto pálido del pepino	CPFVd	Van Dorst y Peters (1974) Sänger y cols. (1976)
Cadang-Cadang del cocotero	CCCVd	Randles (1975) Randles y cols. (1976)
Enanismo del lúpulo	HSVd	Sasaki y Shikata (1977)
Viroide latente de <i>Columnea</i>	CLVd	Owens y cols. (1978)
Mancha solar del aguacate	ASBVd	Palukaitis y cols. (1979) Thomas y Mohamed (1979)
Enanismo apical del tomate	TASVd	Walter (1981) Kiefer y cols. (1983)
Planta macho del tomate	TPMVd	Galindo y cols. (1982)
Cicatriz de la piel de la manzana (apple scar skin)	ASSVd	Hasimoto y Koganezawa (1987)
Tinanangaja del cocotero	CTIVd	Keese y cols. (1988)
Viroide latente del lúpulo	HLVd	Puchta y cols. (1988)
Cachexia de los cítricos	CCaVd CVd-IIb	Semancik y cols. (1988a, 1988b)
Moteado amarillo de la vid (grapevine yellow speckle)	GYSVd	Koltunow y Rezaian (1988)
Moteado amarillo de la vid-2, vid 1B (grapevine yellow speckle-2)	GYSVd-2 G1BVd	Koltunow y Rezaian (1989)
Viroide de la vid Australiana	AGVd	Rezaian (1990)
Viroide del <i>Coleus blumei</i>	CbVd	Spieker y cols. (1990)
Viroide IV de los cítricos	CVd-IV	Puchta y cols. (1991)
Enrollamiento foliar de los cítricos Viroide I de los cítricos	CBLVd CVd-I	Ashulin y cols. (1991)
Cancer y ampollas del peral (pear blister canker)	PBCVd	Hernández y cols. (1992)
Mosaico latente del duraznero	PLMVd	Hernández y Flores (1992)
Moteado de la manzana (dapple apple)	DAVd	Hadidi (1993) no publicado
Viroide III de los cítricos	CVd-III	Rakowski y cols. (1994) Stasys y cols. (1995)
Viroide de la papita mexicana	MPVd	Martinez-Soriano y cols. (1996)
Viroide de Iresine	IrVd	Spieker, R.L. (1996)
Hoyuelo del fruto del manzano (apple dimple fruit)	ADFVd	Di Serio y cols. (1996)
Moteado clorótico del crisantemo	CCHMVd	Navarro y Flores (1997)

Entre las especies vegetales hospedantes de viroides se pueden citar a los frutales (aguacatero, cítricos, manzano, peral y duraznero), hortalizas (tomate, pepino y papa), cultivos industriales (lúpulo, cocotero y vid) y ornamentales (crisantemo, *Coleus blumei* Benth., y *Columnea erythrophaea* Decne ex Houll.), todas ellas con importancia agrícola. Lo anterior resulta crítico considerando el efecto detrimental que ocasionan los viroides en ciertos hospedantes.

A pesar de su descubrimiento desde 1971, poco se conoce sobre el origen y evolución de los viroides; sin embargo, es evidente su distribución cosmopolita, favorecida por la propagación asexual de algunas especies lo cual seguramente contribuyó a su diseminación geográfica. Tampoco se sabe de su ocurrencia en otras formas de vida diferentes a las plantas superiores, su mecanismo de replicación, así como la forma en que causan alteraciones metabólicas en algunos de sus hospederos (Diener, 1979). Un poco alentador parecen las tendencias actuales de investigación encaminadas a la introducción a vegetales de genes que codifican para ribozimas, las cuales son enzimas capaces de degradar al RNA viroidal (Atkins y cols., 1995; Yang y cols., 1997). Otra línea de investigación para la inhibición de infecciones viroidales es el uso de RNAs antisentido en plantas transgénicas (Becker y cols., 1994; Matousek y Rakousky, 1993).

2.3 Caracterización

Los viroides pueden ser caracterizados por métodos físicos, biológicos y moleculares. La caracterización física puede efectuarse según la movilidad electroforética, por afinidad a la celulosa en cromatografía y por hibridación con sondas de RNA complementario (cRNA). Los métodos biológicos se basan en el ámbito de hospederos y en la expresión de síntomas, en tanto que los métodos moleculares se basan en la secuencia de sus bases nucleotídicas (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b).

2.4 Viroides causantes de enfermedades en cítricos

Actualmente se reconoce la existencia de 13 viroides que infectan diversos hospedantes de cítricos. Estos 13 viroides han sido ordenados en 5 grupos distintos, con base principalmente en su tamaño molecular (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Semancik y cols., 1988b; Semancik y Duran-Vila, 1991), y existen variantes para cada

viroide dentro de cada grupo. A pesar de lo anterior, sólo se conocen dos enfermedades en cítricos causadas por estos viroides: exocortis y cachexia (Roistacher, 1991).

2.4.1 Exocortis. Los primeros reportes de la ocurrencia de exocortis en cítricos se realizaron a finales de los años 40's por Fawcett y Klots en 1948, y por Benton y cols. en 1949 (Klots, 1973). Ellos reconocieron la existencia de la enfermedad la cual inicialmente consideraron de origen viral. Desde 1968, Semancik y Weathers investigaron la naturaleza del agente causal de la enfermedad exocortis encontrando que éste tenía bajas tasas de sedimentación y era sensible a ribonucleasas. Al observar al microscopio electrónico tejido infectado por exocortis, no identificaron partículas virales. Posteriormente, en 1972 con base en las evidencias anteriores además de una movilidad en geles de poliacrilamida, concluyeron que exocortis es un viroide. También mostraron que su densidad flotante corresponde a la esperada para un RNA (Semancik y Weathers, 1972).

La exocortis es una enfermedad que causa enanismo y descortezamiento en plantas injertadas sobre portainjertos susceptibles como naranjo trifoliado, citranges, citrumelos y limero Rangpur; se transmite por injerto y por el uso de utensilios agrícolas como navaja, arado, machete y tijeras podadoras (Gamsey y Jones, 1967). El viroide causante de exocortis afecta también otras especies cultivadas de cítricos, así como especies emparentadas y hospedantes no cítricos (Yang y cols., 1992). Entre los principales hospedantes reconocidos se encuentran la cidra Etrog (*Citrus medica* L.) y las herbáceas *Gynura aurantiaca* DC, crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ram.), pepino (*Cucumis sativus* L.) y tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b). En cidra, la exocortis induce enanismo severo, epinastia de las hojas y necrosis en las nervaduras (Roistacher, 1991). Los árboles de naranjo injertados en patrones susceptibles afectados por exocortis pueden reducir su rendimiento hasta en un 40% (Sánchez-Salas, 1980).

Dependiendo de la combinación cultivar/portainjerto, Ochoa y cols. (1996) han observado diferentes síntomas en cítricos afectados por exocortis en Venezuela, por ejemplo, en lima Tahiti/limón Volkamer, el CEVd y otros viroides de cítricos produjeron decoloración de las nervaduras de las hojas, estrías y grietas en la corteza del tallo y ramas del injerto; en naranjo dulce Valencia/limón Volkamer se produjo una reducción del crecimiento y hoyos profundos en la madera del portainjerto.

Con respecto al efecto ambiental, se sabe que temperaturas de 30°C ocasionan un incremento en la concentración de CEVd comparado con 20°C, favoreciendo la expresión de síntomas tempranos en *Gynura aurantiaca* (Diener, 1979), y algo similar ocurre en cidra (Semancik y cols., 1988a).

Hasta la fecha, se han secuenciado 18 variantes del viroide exocortis en diferentes hospedantes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Variantes conocidas del viroide exocortis de los cítricos (GenBank versión 105.0+, abril 1998)

Registro de entrada	Hospedante	Referencia
J02053	<i>Gynura</i>	Gross y cols.(1982)
M34917	cítricos	Visvander y cols.(1982)
K00964	naranja/crisantemo	Visvander y Symons (1983)
K00965	naranja/crisantemo	Visvander y Symons (1983)
M30868	cítricos	Visvander y Symons (1985)
M30869	cítricos	Visvander y Symons (1985)
M30870	cítricos	Visvander y Symons (1985)
M30871	cítricos	Visvander y Symons (1985)
Y00328	vid	García-Arenal (1987)
X53716,S50398	tomate	Mishra y cols.(1991)
S67437	cidra	Semancik y cols.(1993)
S67438	<i>Gynura</i>	Semancik y cols.(1993)
S67440	tomate	Semancik y cols.(1993)
S67441	tomate	Semancik y cols.(1993)
S67442	tomate	Semancik y cols.(1993)
S67446	tomate (callos)	Semancik y cols.(1993)
U21126	<i>Citrus paradisi</i> Macf.	Bar-Joseph (1995) sin publicar
S79831	haba	Fagoaga y cols.(1995)

2.4.2 Cachexia o xiloporosis. Childs en 1950 reportó por primera vez la ocurrencia de esta enfermedad a la que denominó cachexia, cuyo significado viene del griego kakos=malo y hexis=condición. La cachexia de los cítricos afecta principalmente mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) y algunos de sus híbridos como tangelos (*C. reticulata* Blanco x *C. paradisi* Macf.); asimismo también causa daños de diferente magnitud en kumquats (*Fortunella* sp) y limón macrofilo (*C. macrophylla* Wester) (Semancik y cols., 1988a, 1988b). Los síntomas consisten en hoyos o acanaladuras en la madera y obstrucción de la corteza causando decoloración, impregnación de goma en la corteza, enanismo, clorosis y declinamiento del árbol (Roistacher, 1988;

Roistacher y Garnsey, 1988). Muchas variedades de cítricos incluyendo toronja, *C. paradisi* Macf.; naranja dulce, *C. sinensis* (L.) Osb. y limón, *C. limon* (L.) Burm. f. son portadoras asintomáticas de cachexia (Roistacher, 1988). Al igual que la exocortis, la cachexia se transmite por injerto y por el uso de utensilios agrícolas como navaja, arado, machete y tijeras podadoras (Roistacher, 1988, 1991).

La naturaleza viroidal de cachexia fue reportada por Semancik y cols. en 1988, para un viroide de 299 nucleótidos (Semancik y cols. 1988a, 1988b; Semancik y Duran-Vila, 1991). En un ensayo de hibridación con otros viroides de cítricos, incluyendo el viroide exocortis, se obtuvieron resultados negativos. En estudios posteriores (Albanese y cols., 1991; Davino y cols., 1991; Sano y cols., 1988), se determinó una homología superior del 95% entre el viroide cachexia y el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd), lo cual ha ocasionado que se considere al viroide cachexia como variante del HSVd (Sano y cols., 1988; Shikata, 1990). Actualmente, se han reportado 34 secuencias nucleotídicas distintas para el HSVd (GenBank versión 105.0+, abril 1998), de las cuales al menos 3 infectan cítricos (Shikata, 1990).

A continuación se presentan las 34 variantes reportadas para el viroide enanismo del lúpulo (Cuadro 3), el cual es homólogo al viroide cachexia.

Cuadro 3. Variantes conocidas del viroide enanismo del lúpulo (GenBank versión 105.0+, abril 1998).

Registro de entrada	Hospedante	Referencia
X00009	lúpulo	Ohno y cols. (1983)
X00524	pepino	Sano y cols. (1984)
M35717	vid	Sano y cols. (1986)
X06718	cidra	Sano y cols. (1988)
X06719	cidra	Sano y cols. (1988)
X07405	pepino	Puchta y cols. (1988)
X12537	lúpulo	Lee y cols. (1988)
X06873	vid	Puchta y cols. (1988)
X15330	vid	Puchta y cols. (1989)
X13838	toronja	Puchta y cols. (1989)
D13765, D00480	durazno	Sano y cols. (1989)
D00479, D13764	durazno y ciruelo	Sano y cols. (1989)
U02527	cidra	Hsu y cols. (1993), Owens (1993) sin publicar
X69518	cidra	Levy y Hadidi (1994)
X69519	naranja dulce	Levy y Hadidi (1994)
X87924	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar

X87928	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar
X87923	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar
X87925	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar
X87926	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar
X87927	vid	Gross, H.J. (1995) sin publicar
Y08438	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y08439	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09343	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09344	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09345	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09346	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09347	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09348	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09349	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09350	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09351	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y09352	durazno	Kofalvi y cols. (1997)
Y14050	vid	Palkovics, L. (1997) sin publicar

2.4.3 Otros viroides de cítricos. En adición a los viroides exocortis y cachexia, se han encontrado otros viroides asociados a plantas de cítricos (Cuadro 4) (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Semancik y cols., 1988b; Semancik y Duran-Vila, 1991); tales viroides se han encontrado en infecciones mixtas en plantas afectadas ya sea por exocortis o por cachexia y su patogenicidad se ha determinado para algunos de ellos (Hadas y Bar-Joseph, 1991; Polizzi y cols., 1991; Roistacher y cols., 1991, 1993).

Cuadro 4. Catálogo consenso de viroides de cítricos (Semancik y Duran-Vila, 1991)

Grupo	Viroide	Nucleótidos
CEVd	CEVd	371
I	CVd-Ia	340
	CVd-Ib	330
	CVd-Ic	317
II	CVd-IIa	302
	CVd-IIb (CCaVd)	299
	CVd-IIc	298 (Australia)
	CVd-IIc	297 (California)
III	CVd-IIIa	292
	CVd-IIIb	290
	CVd-IIIc	285
	CVd-IIId	280
IV	CVd-IV	275

Para el ordenamiento de los viroides en 5 grupos distintos, además de la talla molecular, se ha utilizado la capacidad de infectar a un grupo de plantas herbáceas diferenciales (Cuadro 5), así como su reactividad entre ellos a hibridización con sondas marcadas (Semancik y Duran-Vila, 1991).

Cuadro 5. Transmisión e intensidad sintomatológica de viroides de cítricos en especies herbáceas (Semancik y Duran-Vila, 1991).

Grupo	Viroide	Cidra	Crisantemo	<i>Gynura</i>	Pepino
CEVd	CEVd	++++	++++	++++	+
I	CVd-Ia	++	-	-	-
	CVd-Ib	++	-	-	-
II	CVd-IIa	+	+++	-	++
	CVd-IIb	+	++	-	++
	CVd-IIc	+	++	-	++
III	CVd-IIIa	+++	-	-	-
	CVd-IIIb	+++	-	-	-
	CVd-IIIc	+++	-	-	-
	CVd-IIId	+++	-	-	-
IV	CVd-IV	+++	-	-	+

++++ sintomático severo, +++ moderado, ++ débil, + asintomático infectado, -asintomático no infectado

Otra propiedad que hace distintiva a estos grupos es su similitud con alguna familia de viroides, de tal forma que CEVd semeja mucho con el grupo del tubérculo fusiforme de la papa; CVd-I también llamado enrollamiento foliar de los cítricos (CBLVd) contiene parte de la región conservada del viroide causante del cicatrizado de la piel de la manzana (ASSVd); el grupo II de viroides de cítricos incluyendo al agente causal de la enfermedad cachexia, han sido descritos como parte de la familia del viroide enanismo del lúpulo (Levy y Hadidi, 1993; Puchta y cols., 1989; Sano y cols., 1988; Yang y cols., 1992). Rakowski y cols. (1994) determinaron la relación de los viroides de cítricos del grupo III con la familia ASSVd. CVd-IV parece tener relación con el viroide exocortis de tipo quimera o viroide recombinante (Puchta y cols., 1991).

2.5 Extracción del RNA

El éxito final en la detección de viroides por cualquier método basado en la extracción del RNA, depende de la calidad de la preparación obtenida del tejido infectado, por lo tanto la composición del medio de extracción debe ser a la medida de la especie y el tejido en estudio. En el caso de métodos de detección basados en la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un factor limitante para el diagnóstico rutinario es la preparación de buena calidad de ácidos nucleicos libres de inhibidores de la reacción. La mayoría de los procedimientos de extracción no remueven contaminantes del tipo polisacáridos, ni compuestos fenólicos en plantas, los cuales pueden tener efectos inhibitorios directos en la amplificación por PCR (Henson y French, 1993; MacKenzie y cols., 1997).

2.5.1 Cromatografía del RNA en celulosa (CF-11). Esta técnica puede ser utilizada rutinariamente como un procedimiento preparativo para la remoción de DNA y otros componentes pigmentados contenidos en la fracción soluble extraída. La unión selectiva del RNA viroidal a cierta concentración de etanol puede ser explotada en la recuperación de viroides a partir de extractos de tejidos (Semancik y cols., 1975). La cromatografía en celulosa CF-11 fue usada por Semancik para caracterizar diferentes RNAs viroidales mediante una elución seriada con gradientes de etanol la cual también podría ser utilizada para remover RNA hospedero contaminante así como para separar viroides individuales por elución selectiva con diferentes concentraciones de etanol (Semancik, 1986).

2.6 Detección de viroides

Existen varios métodos para la detección de agentes infecciosos en material de propagación de cítricos, entre los que se pueden citar el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), electroforesis secuencial (sPAGE), aislamiento de procariotes en medio de cultivo (bacterias, espiroplasmas, etc), análisis de RNA de doble cadena, microscopía electrónica de inmunoadsorción y la hibridación con ácidos nucleicos (FAO-IBPGR, 1991; Roistacher, 1991); sin embargo, para el caso de viroides se aplican el uso de plantas indicadoras (Roistacher, 1991), el análisis electroforético en geles de poliácridamida (Baksh y cols., 1984; Boccoardo y cols., 1984; Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Gillings y cols., 1988; Semancik y cols., 1988a, 1988b), y más recientemente la

hibridación molecular (Diener y cols., 1988; Semancik y Duran-Vila, 1991) y la amplificación enzimática de ácidos nucleicos (Yang y cols., 1992).

La técnica serológica ELISA que es considerada como rápida y económica para detecciones virales, no ha podido ser aplicada en la detección de viroides por ser entidades biológicas de RNA de cadena circular sencilla desprovista de cápside protéica (Flores, 1988). A continuación se describen los métodos utilizados en el diagnóstico de enfermedades de origen viroidal en cítricos.

2.6.1 Bioensayos en plantas indicadoras. Calavan y cols. (1964) desarrollaron un método para la detección del viroide exocortis el cual se basa en la producción de epinastia y enanismo en la planta cidra Etrog (*Citrus medica* L.). Posteriormente, este método fue mejorado por Roistacher y cols. (1977) utilizando una selección de cidra del cv Arizona, lo cual redujo el tiempo para la expresión de síntomas (Roistacher, 1991). Actualmente aún se utiliza este método por ser sencillo y sensible, pero tiene la desventaja de que la manifestación de los síntomas aparece entre los 3 y 6 meses después de la inoculación (Garnsey y Jones, 1967); sin embargo, existen razas débiles del patógeno que podrían pasar desapercibidas por la ausencia de síntomas acentuados. Asimismo esta técnica requiere de espacio considerable en el invernadero así como un riguroso control de la temperatura del mismo (Roistacher, 1991).

Para la detección de cachexia, el indicador biológico empleado rutinariamente es el mandarino Parson's Special injertado sobre limón rugoso (*C. jambhiri* Lush.), con un período de incubación de 12-18 meses. La determinación de cachexia se lleva a cabo efectuando una insición rectangular en la corteza para observar la aparición de pequeñas acanaladuras con exudación de goma en la madera (Roistacher, 1991).

Para llevar a cabo el cultivo de viroides *in planta*, se utilizan plántulas de cidra (*C. medica* L.) de la selección Arizona 861-S1, la cual es más sensible a CEVd y se crece en altas temperaturas de invernadero (40°C) para promover la multiplicación de los viroides y expresión sintomática en algunos de ellos (Semancik y cols., 1988b).

2.6.2 Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). El análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida fue el método de detección de viroides más utilizado en la década de los 80's. Se aplicó para detectar entre otros viroides al tubérculo fusiforme de la papa (Pfannenstiel y cols., 1980), enanismo del crisantemo (Horst y Kawamoto, 1980), cadang-cadang del cocotero (Randles y cols., 1980) y

mancha solar del aguacate (Utermohlen y Ohr, 1981). El método consiste en separar las moléculas del RNA viroidal en un gel de poliacrilamida pasando corriente eléctrica a través de éste. Con este principio general, se han desarrollado diferentes modalidades como el PAGE bidimensional descrito por Schumacher y cols. (1983), la electroforesis secuencial desarrollada por Semancik y Harper (1984), y el retorno a PAGE de Schumacher y cols. (1986), quienes con estos antecedentes realizaron una electroforesis secuencial en cidra, revelando la presencia de RNA viroidales más pequeños que CEVd. Otra aportación importante para separar viroides fue realizada por Rivera-Bustamante y cols. (1986) al implementar un sistema de electroforesis en pH discontinuo el cual separa aún más las formas circulares del resto de los RNAs hospederos.

2.6.3 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático *in vitro* de amplificación cíclica de secuencias específicas de DNA (Mullis, 1990). Este método se caracteriza por su especificidad y sensibilidad; sin embargo, debido a que la enzima utilizada *Taq* DNA polimerasa no amplifica RNA, es necesario realizar como primer paso una transcripción inversa para formar DNA complementario (cDNA). La sensibilidad de este ensayo puede ser hasta de un picogramo de RNA del viroide (Yang y cols., 1992).

Mediante una transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha sido posible la detección de viroides causantes del cicatrizado de la piel de la manzana (ASSVd), el PSTVd y el HSVd entre otros (Hadidi y Yang, 1990; Yang y cols., 1992). Un aspecto clave es el diseño de iniciadores específicos para lo cual es indispensable el conocimiento de la secuencia nucleotídica del viroide a amplificar. En el caso de CEVd se conoce su secuencia desde 1982, misma que fue publicada en forma simultánea e independiente por Gross y cols. (1982) y Visvander y cols. (1982) en tanto que para cachexia se conoce desde 1983 (Ohno y cols., 1983).

2.6.4 Hibridación de ácidos nucleicos. La hibridación molecular es un método utilizado para comparar la homología en secuencias nucleotídicas entre porciones de ácidos nucleicos de origen distinto. Para viroides, la hibridación molecular fue desarrollada primeramente por Owens y Diener (1981) para el tubérculo fusiforme de la papa (PSTVd) utilizando una sonda con un marcador radioactivo. A partir de entonces se hicieron modificaciones a este procedimiento debido a que el uso de sondas radiomarcadas estaba limitado a pocos laboratorios. Recientemente se describió la preparación y uso de sondas moleculares no-radioactivas (McInnes y cols., 1989; Roy y

cols., 1989) utilizando para el marcado biotina, fotobiotina y digoxigenina; este último detectado por inmunoensayo ligado a la enzima, es decir la detección de la molécula blanco se basa en la unión del conjugado fosfatasa alcalina-antiDIG a la digoxigenina y la hidrólisis del sustrato enzimático particular resulta en la elaboración de un producto coloreado o quimolumincente (Lebedeva y cols., 1993; Singh y cols., 1994).

El uso de sustratos quimolumincentes ha mejorado la sensibilidad de la detección al doble (Podleckis y cols., 1993) pero se sigue prefiriendo el uso de sustratos colorimétricos porque la prueba no requiere películas de rayos X y procesamiento, y por ausencia de problemas de reacción de fondo que a veces ocurren en pruebas de quimoluminencia (Singh y cols., 1994).

La técnica radioactiva es la que más se ha utilizado en cítricos, en donde permitió la identificación del viroide B de los cítricos, el CVd-IIa y CVd-IIb, los cuales son cepas del viroide enanismo del lúpulo, HSVd (Diener y cols., 1988); también la técnica permitió establecer la relación entre el viroide asociado con el manchado de manzanas canadienses y norteamericanas, y el agente causal del cicatrizado de la piel de manzanas japonesas (Hadidi y cols., 1990).

III. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Patología Molecular y Virología Vegetal de la Unidad de Biología Celular y Molecular del convenio entre el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). Los bioensayos se hicieron en el invernadero de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL localizado en Ciudad Universitaria, en el Municipio de San Nicolás de los Garza, y en el invernadero del Campo Experimental General Terán (CEGET) del INIFAP ubicado en General Terán, N.L.

De manera global, el trabajo comprendió: i) la comparación de 5 métodos de extracción del RNA para la detección directa de viroides; ii) la implementación de la técnica de electroforesis secuencial (sPAGE); iii) el establecimiento de las condiciones de reacción de la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de los viroides exocortis y cachexia de los cítricos; iv) así como la validación de las técnicas anteriores utilizando muestras de campo de 5 localidades del país; y el cultivo y conservación *in planta* de los viroides detectados, en plantas herbáceas y leñosas (Fig. 1).

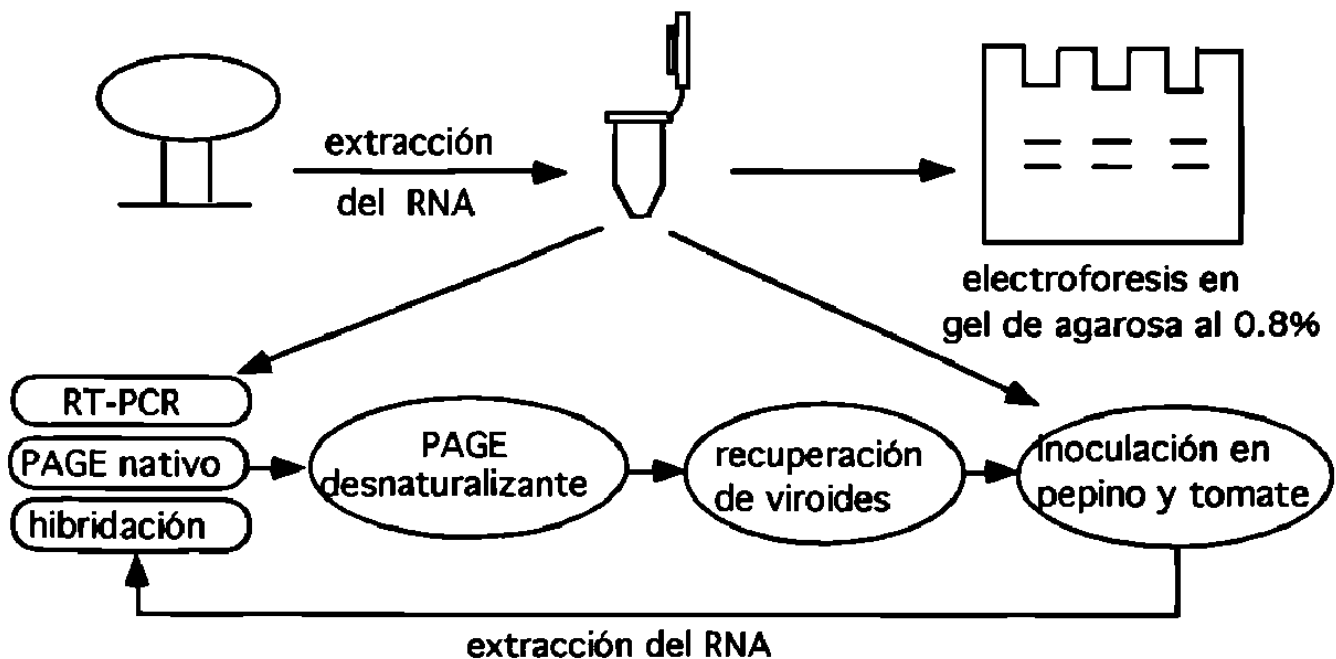


Fig. 1. Esquema general del procedimiento realizado para la implementación y validación de técnicas moleculares de detección de viroides en cítricos.

3.1 Fuente de viroides y material vegetal

Inicialmente, para la implementación de la técnica de electroforesis secuencial se utilizaron viroides de la colección de la Universidad de Florida, los cuales fueron parcialmente purificados a partir de cítricos y crisantemo, con claves de registro: 2094, 2095, 2158, 2169, 0100, E10, E13, E21 y E21a. Estos aislamientos contienen los viroides causantes de exocortis y cachexia de cítricos, el enanismo del crisantemo y un testigo sano, y fueron donados gentilmente por el Dr. Richard F. Lee de la Universidad de Florida en los E.U. Posteriormente, se utilizaron 9 especies vegetales con 22 cultivares en total, tanto para el establecimiento de las técnicas de detección, como para la validación y transmisión de viroides (Cuadro 6). Algunas de ellas comprendieron muestras de campo con infección natural por viroides, mientras que otras fueron plantas crecidas a nivel de invernadero, las cuales fueron inoculadas con yemas provenientes de plantas infectadas en forma natural en el campo.

Cuadro 6. Especies vegetales utilizadas para la detección y transmisión de RNAs patogénicos de plantas.

Nombre común	Nombre científico
cidra Etrog	<i>Citrus medica</i> L. cv Arizona 861
citrange	<i>C. sinensis</i> x <i>Poncirus trifoliata</i> cv Troyer
limón Persa	<i>C. latifolia</i> Tan.
mandarino	<i>C. reticulata</i> Blanco cv Parson's Special
mandarino Cleopatra	<i>C. reshni</i> Hort. ex Tan.
naranja agrio	<i>Citrus aurantium</i> L.
naranja dulce	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osb. (14 cultivares)
pepino	<i>Cucumis sativus</i> L. cv Poinsett
tomate	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. cv Rutgers

Para los experimentos encaminados al establecimiento de las técnicas de electroforesis secuencial y RT-PCR, además de los viroides de Florida, se efectuaron extracciones de RNA a partir de plantas indicadoras. Un aislamiento se obtuvo de cidra Etrog sana, y otro de cidra inoculada con el viroide exocortis con reacción de epinastia foliar. Otros dos aislamientos fueron obtenidos a partir de mandarina Parson's Special, uno de ellos sano y el otro con reacción provocada por la

inoculación con el viroide causante de cachexia. Estos 4 aislamientos fueron obtenidos por extracción del RNA de colectas de plantas mantenidas bajo resguardo en el CEGET. Para los experimentos de validación de las técnicas arriba mencionadas se seleccionó un lote de variedades establecido en el CEGET del INIFAP, compuesto por árboles adultos de 14 variedades de naranjo de producción temprana, con antecedentes de infección asintomática por viroides (Sánchez-Salas, 1980), así como plantas de limón Persa (*C. latifolia* Tan.) colectadas en huertos comerciales de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán. Esta especie se incluyó en el estudio, principalmente por la elevada ocurrencia de agrietamientos en tronco principal y ramas, aparentemente relacionadas con viroides (Ochoa y cols., 1996; Salibe y Moreira, 1965). Las colectas de limón Persa fueron realizadas en diferentes épocas del año, sin un orden pre-establecido. En el Cuadro 7 se enlistan los materiales de naranjo dulce y limón Persa utilizados para la validación de los métodos de electroforesis secuencial y pruebas de RT-PCR.

Cuadro 7. Colectas de limón Persa y naranjo dulce efectuadas en diferentes localidades.

Localidad	Fecha de colecta	Fecha de recepción	Especie	No.
Gral. Terán repe-I	2 junio de 1997	3 junio 1997	naranjo dulce	9
Gral. Terán repe-II	-	3 julio 1997	naranjo dulce	14
Gral. Terán repe-III	-	8 julio de 1997	naranjo dulce	13
Gral. Terán repe-IV	14 julio de 1997	14 julio de 1997	naranjo dulce	14
Tabasco	-	29 enero de 1996	limón Persa	10
Tabasco	-	5 septiembre 1996	limón Persa	36
Tabasco	25 abril de 1997	30 abril de 1997	limón Persa	36
Tamaulipas	17 julio de 1996	17 julio de 1996	limón Persa	7
Veracruz	2 octubre de 1996	5 octubre de 1996	limón Persa	5
Veracruz	-	9 octubre de 1996	limón Persa	2
Yucatán	-	6 febrero de 1997	limón Persa	5
Yucatán	1 sept. de 1997	3 sept. de 1997	limón Persa	5
Yucatán	noviembre de 1997	10 nov. de 1997	limón Persa	8

Localidad Tabasco. Localizada en el Municipio de Huimanguillo. La plantación tiene entre 5 y 8 años de establecida y la totalidad de los árboles muestran síntomas de agrietamiento de la corteza en tronco y ramas principales, algunos de ellos mostrando un deterioro considerable en el vigor del árbol. El portainjerto predominante es naranjo agrio. Se seleccionaron 18 árboles con 3 niveles de deterioro en la vigorosidad: 6 árboles vigorosos, con síntomas poco aparentes de agrietamiento en las ramas; otros 6 árboles con un deterioro moderado y síntomas evidentes de agrietamiento en las ramas, y 6 árboles más con un deterioro acentuado y síntomas severos de agrietamiento.

Localidad Yucatán. Se realizaron colectas de varetas de limón Persa en dos huertas ubicadas en el estado de Yucatán. La primera colecta consistió en muestras de 5 árboles ubicados en una huerta de 5 años, plantada sobre naranjo agrio como portainjerto. Se seleccionaron 2 árboles vigorosos sin síntomas visibles de agrietamiento de las ramas; y 3 árboles con un deterioro moderado en la vigorosidad con síntomas de agrietamiento moderado en el tallo y ramas. Esta misma huerta fue colectada nuevamente 7 meses después. Con respecto a la segunda huerta, corresponde a una plantación en desarrollo de 3 años de edad, injertada en limón macrofila (*C. macrophylla* Wester), seleccionando 2 árboles vigorosos sin síntomas visibles de agrietamiento de las ramas; y 6 árboles con síntomas de agrietamiento moderado en el tallo y ramas. Los árboles muestreados en ambas huertas estaban plantados en lotes adyacentes; en la huerta plantada sobre limón macrofila como portainjerto, los árboles que mostraban síntomas de agrietamiento en las ramas adicionalmente tenían un tamaño reducido en la copa.

Localidad Tamaulipas. Huerta localizada en el km 144 de la carretera Victoria-Mante en el Municipio de Llera de Canales. Tiene una superficie de 200 ha y los árboles tienen una edad aproximada de 8 años. Se encuentran injertados sobre naranjo agrio y originalmente contenían limón mexicano como copa, el cual fue remplazado por limón Persa. La totalidad de los árboles muestreados en esta localidad mostraban un deterioro acentuado en la copa con síntomas notorios de agrietamiento en las ramas y tronco.

Localidad Veracruz. Se colectaron 5 muestras de igual número de árboles sintomáticos, y 2 muestras de apariencia sana. La procedencia del material vegetal fue un rancho del Municipio de Tlapacoyan.

Para los experimentos de transmisión y conservación *in planta*, se utilizaron especies herbáceas y leñosas. En el primer caso se utilizó tomate y pepino, en tanto que en el segundo caso se realizó la transmisión por injerto de yema a citrange Troyer, mandarino Cleopatra, naranjo agrio, cidra Etrog y naranjo Pineapple.

3.2 Extracción del RNA

Con base en información existente, se seleccionaron para evaluación 5 métodos de extracción del RNA, cuatro de los cuales fueron originalmente diseñados para la detección de viroides en papa, lúpulo y cítricos, y un quinto método para uso más amplio en seres vivos. Todos los métodos fueron ligeramente modificados con respecto a su versión original.

Método Pfannenstiel y cols. (1980). Se pesó 1 g de tejido, se lavó con agua bidestilada y se secó con papel absorbente antes de colocarlo en el mortero para evitar su adhesión al mismo. Se transfirió la muestra al mortero y se le agregó nitrógeno líquido macerando con rapidez hasta pulverizar completamente y luego se transfirió el polvo a tubos de centrifuga (Nalgene, cat. 3119-0050) con capacidad de 50 ml y colocados previamente en hielo. Se le agregó a cada tubo 1 ml de agua tratada con dietil pirocarbonato, DEPC (Sigma), 0.4 ml de ácido etilendiaminotetracético sal disódica (Na_2EDTA) 0.1 M, 0.4 ml de NH_4OH 4 M y 1.2 ml de LiCl 10 M. Se agitó en vortex cada solución y el coctel descongelando cuando fue necesario. Se agregaron 8 ml de fenol (Sigma) el cual fue saturado en solución de Tris-HCl 0.2 M pH 8 y se agitó en vortex.

Se pasó a una centrifuga con refrigeración (0-4°C) a 20,000 rpm durante 30 min formándose tres fases: RNA, proteínas y fenol. Se tomó todo el sobrenadante (3 ml aprox.) y se le agregaron 2.5 volúmenes (7.5 ml aprox.) de acetato de potasio al 2% en etanol absoluto (etanol salado); se agitó suavemente sin vortex para precipitar los ácidos nucleicos y se refrigeró 2 horas o toda la noche a -20°C. Posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones (20,000 rpm/10-30 min), se eliminó el etanol salado (decanter), se lavó el precipitado con 700 µl de etanol al 80% para eliminar el acetato moviendo por agitación, y se resuspendió el precipitado en 1 ml de agua tratada con DEPC previo secado del etanol por inversión del tubo. Para uso inmediato se dejó el RNA en agua tratada con DEPC, o bien para uso posterior se conservó en etanol salado a -20°C (2.5 volúmenes, 7.5 ml aprox.).

Método de Chomczynski y Sacchi (1987). En un mortero estéril se molió 1 g de tejido vegetal con nitrógeno líquido y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml. Se agregaron 10 ml de solución D (tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM, sarcosyl al 0.5% y 2-mercaptoetanol [Sigma] 0.1 M) y 1 ml de acetato de sodio 2 M pH 4 agitando por 1 min en vortex. Se añadieron 10 ml de fenol saturado y se agitó durante 2 min adicionales en vortex. Se agregaron 2 ml de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico 48:1 (v/v) y se volvió a agitar en vortex otros 3 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C. Posteriormente se recuperó la fase acuosa y se precipitó el RNA agregando 1 volumen de etanol absoluto (99.9%) frío, se agitó por inversión y se colocó a -20°C por lo menos 1 hora. Luego se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, se decantó y se lavó el precipitado en dos ocasiones con etanol al 80%. Finalmente fue resuspendido el precipitado en 1 ml de agua tratada con DEPC.

Método de Pallás y cols. (1987). Debido a que el método original requiere de 20 g de tejido, todas las soluciones fueron ajustadas a la cuarta parte quedando de la siguiente manera: se maceraron 5 g de tejido de corteza en morteros con nitrógeno líquido. Se homogenizó con 4 ml de Tris-HCl 0.2 M pH 8.9, 1 ml de Na₂EDTA 0.1 M pH 7, 1 ml de SDS 5%, 10 ml de fenol saturado y 12.5 µl de 2-mercaptoetanol. Se agitó vigorosamente durante 30 min y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se agregó 1 ml de solución amortiguadora STE 10X (Tris 0.5 M, NaCl 1 M y Na₂EDTA 10 mM) y 3.5 ml de etanol absoluto. Se ajustó el volumen a 10 ml con agua destilada estéril (para que el etanol quede finalmente al 35%). Se colocaron 0.6 g de celulosa fibra mediana, CF-11 (Sigma, cat. C-6288) y se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min a 20°C, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 15 ml de solución amortiguadora STE 1X con 35% de etanol, se lavó dos veces más con otros 15 ml más 15 ml (30 ml) de la misma solución y se transfirió dentro de la columna con el último lavado. Se eluyeron los ácidos nucleicos con 3 lavados de 1.6 ml de solución amortiguadora STE 1X sin etanol recogiendo cada lavado en tubos diferentes. Se agregaron 160 µl (0.1 volumen) de acetato de sodio 3 M y 4 ml (2.5 volúmenes) de etanol absoluto. Se dejó toda la noche a -20°C. Al día siguiente se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 min a 4°C, se secó el precipitado por inversión, se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC estéril y se conservó a -20°C.

Método de Yang y cols. (1992). Un gramo de corteza de tejido fue cortado en piezas pequeñas de aproximadamente 1-2 cm² y triturado con nitrógeno líquido. Se hizo una extracción durante 20 min en 6 ml de una solución amortiguadora que contenía glicina-NaOH 0.1 M pH 9, NaCl 50 mM, Na₂EDTA, dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2% y sarcosina lauril de sodio (SLS) al 1%. Cada extracto de la muestra fue mezclado con 8 ml de fenol saturado con Tris-HCl 0.2 M pH 7.6 conteniendo 8-hidroxiquinoleína al 0.1% y 2-mercaptoetanol al 0.2% durante 15 min. Se agregaron 8 ml de cloroformo y se mezcló en vortex por otros 15 min. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 min y se recuperó la fase acuosa en otro tubo precipitándose los ácidos nucleicos por la adición de 2.5 volúmenes de etanol salado manteniéndose la mezcla a -20°C toda la noche.

Al día siguiente, los ácidos nucleicos fueron recuperados por centrifugación a 10,000 rpm durante 30 min en una centrífuga refrigerada (4°C). El precipitado fue disuelto en 1 ml de agua tratada con DEPC y almacenado a -20°C hasta su uso.

Método de Lee (1995). Para cada muestra se preparó un tubo de centrifuga de 50 ml con las siguientes soluciones: 18 ml de solución amortiguadora GPS 2X (glicina 0.2 M, Na₂HPO₄ 0.1 M y NaCl 0.6 M) estéril y con pH 9.6, 2 ml de SDS al 10%, 200 µl de 2-mercaptoetanol, 2.4 ml de fenol saturado y 2.6 ml de una solución de cloroformo-alcohol isoamílico, 12:1 v/v.

Se usaron 4 g de tejido de corteza joven para cada muestra, se molió con nitrógeno líquido usando un mortero y un brazo de porcelana. Se transfirió el polvo al tubo de centrifuga con los reactivos señalados, se cerró y se colocó en hielo agitando ocasionalmente en un vortex durante los siguientes 15-20 min. Se centrifugó a 10,000 rpm por 15 min. La fase acuosa (fracción superior) fue transferida a otro tubo de centrifuga estéril de 50 ml en el cual se habían colocado 6.8 ml de etanol absoluto (99.9%) y 1 g de celulosa CF-11, se ajustó el volumen a 20 ml con solución GPS 2X. Se cerró el tubo y se colocó en un vortex durante 15-20 min. Después de transcurrido este tiempo, se transfirió la solución a una minicolumna. Una vez que pasó todo el líquido a través de la celulosa CF-11, se lavó con 80 ml de solución amortiguadora STE 1X pH 6.9 (Tris 0.05 M, Na₂EDTA 1 mM y NaCl 0.1 M) con 25% de etanol frío. El RNA fue eluido de la celulosa en otro tubo de centrifuga de 50 ml estéril por adición de 1 ó 2 alícuotas de 5 ml de solución STE 1X sin etanol. Se agregaron 15 ml (3 volúmenes) de etanol absoluto frío además de 200 µl de acetato de sodio 3.5 M al tubo que contenía el RNA recuperado por elución, se mezcló y se almacenó toda la

noche a -20°C ó una hora a -70°C . Posteriormente se colectaron los ácidos nucleicos por centrifugación (10,000 rpm por 30 min) eliminando cuidadosamente el sobrenadante, se secó al ambiente y se resuspendieron en 400 μl de agua tratada con DEPC estéril. Estos 400 μl fueron separados en 2 tubos Eppendorf, uno con 380 μl y otro con el resto (20 μl ó más), al primer tubo se le agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto más 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5. Ambos fueron almacenados a -20°C .

Con los 5 métodos descritos, se probó la variante con y sin purificación a través de una columna de celulosa CF-11 y extracción a partir de hoja y corteza. Se cuantificó la cantidad de RNA total por espectrofotometría y se visualizó en geles de agarosa y poliácridamida. Adicionalmente se realizó una extracción por el método de Lee (1995) a los 1, 20, 40 y 60 días después de la colecta en una muestra de limón Persa.

Para el caso de la extracción en tubos de 50 ml, se utilizó una centrifuga Beckman modelo J2-21 con rotor JA-20.

3.2.1 Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA. Para la cuantificación del RNA se utilizó un espectrofotómetro marca Beckman con luz UV modelo DU650 y se leyó la absorbancia a longitudes de onda de 260 y 280 nm respectivamente. En todos los casos se prepararon 2 repeticiones, una de ellas con el doble de concentración que la otra, dichas repeticiones fueron promediadas.

Para el cálculo de la concentración de RNA, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{RNA (ng}/\mu\text{l ó } \mu\text{g/ml)} = \frac{\text{volumen de la celda}}{\text{volumen de la muestra}} \times 40 \times \text{absorbancia}_{260}$$

de tal forma que:

$$\text{RNA} = 8000 \times \text{absorbancia}_{260} \text{ para una dilución de } 6.5 \mu\text{l en } 1300 \mu\text{l, y}$$

$$\text{RNA} = 4000 \times \text{absorbancia}_{260} \text{ para una dilución de } 13 \mu\text{l en } 1300 \mu\text{l}$$

Como parámetro de calidad se comparó la relación entre las absorbancias ($A_{260/280}$) así como la definición de bandas en un gel de agarosa al 0.8%. Se utilizó como solución amortiguadora de corrida al TBE 0.5X (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico

45 mM y Na₂EDTA 1 mM) igual que para la preparación del gel, fraccionándose el RNA a 60 voltios (V) durante 15 min, y otros 30 min adicionales, a 100 V.

3.3 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida

3.3.1 Establecimiento de la técnica. Para el establecimiento de la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida, se efectuaron análisis en geles nativos y geles desnaturalizantes siguiendo como base el procedimiento desarrollado por Rivera-Bustamante y cols. (1986). Junto con la implementación de la técnica, se consideró la optimización de factores involucrados en la separación del RNA, preparación y tinción de los geles. Los factores evaluados fueron: i) grosor del gel (0.75 y 1.5 mm); ii) ubicación de la 'zona viroidal' en el gel nativo para su corte y separación en un segundo gel; iii) tipo de solución amortiguadora para la preparación del gel y su corrimiento; iv) así como el pH de ambos; v) aplicación de corriente constante para la separación del RNA; vi) variación en las proporciones de los componentes de la solución fijadora (alcohol etílico-ácido acético-agua); vii) así como la tinción a base de bromuro de etidio y nitrato de plata.

En todos los experimentos de electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizaron 2 cámaras verticales: una cámara acrílica de fabricación local con dimensiones del gel de 11 x 18 cm, y una cámara Mighty Small II (Hofer, cat. SE250) con dimensión del gel de 10 X 8 cm; la primera adaptada a una fuente de poder ISS 250 y la segunda a una fuente de poder Hofer (cat. PS500XT). Una descripción más detallada del procedimiento se describe a continuación.

Previo a la separación del RNA por electroforesis, se prepararon las muestras (RNA total) mismas que fueron colectadas por centrifugación (3 min a 10,000 rpm a temperatura ambiente), posteriormente se les dió un lavado con 200 µl de etanol al 80%, se secaron por inversión del tubo y se resuspendieron en 30 µl de agua Mili-Q .

PAGE nativo al 5%. Después de ensamblar los cristales para recibir la solución a polimerizar, en un vaso de precipitado pequeño se mezclaron las soluciones señaladas en el Cuadro 8A, cuyo volumen fue dependiente del tipo de cámara y de los separadores utilizados. Se transfirió la mezcla a las placas de cristal y se colocó el peine para dejar polimerizar por lo menos durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se removió el peine y se ensamblaron las placas de cristal en la cámara de

electroforesis enjuagando los orificios dejados por el peine con solución TAE 1X (Tris 40 mM, acetato de sodio 20 mM y Na₂EDTA 1 mM). Se recorrió el gel a 75 V durante 15 min, posteriormente se cargaron los orificios con 15 µl de la muestra adicionados de 2 µl de colorante Halt (azul de bromofenol 0.3% y xilencianol 0.3% en glicerol al 70%) y se aplicó corriente constante de 40 miliamperios (mA) durante 15 min y 54 mA durante 2.5 horas adicionales o hasta que el colorante xilencianol estuvo a punto de salir (0.5-1 cm arriba del borde inferior). Se desensamblaron las placas de cristal y se cortó 1 cm de la parte inferior del gel, se removió el resto del gel y se volvieron a ensamblar los cristales (Fig. 2).

Cuadro 8. Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 5% (A) y al 7% desnaturizante con urea 8 M (B) dependiente del volumen a utilizar.

(A)

Solución/Volumen (ml)	5	10	15	20
Agua bidestilada estéril (ml)	3.63	7.25	10.9	14.5
TAE 10X pH 7.2 (ml)	0.5	1	1.5	2
Poliacrilamida al 30% (ml)	0.83	1.65	2.5	3.3
Temed (µl)	6.25	12.5	18.8	25
Persulfato de amonio al 10% (µl)	50	100	150	200

(B)

Solución/Volumen (ml)	5	10	15	30
Urea (g)	2.4	4.8	7.2	14.4
Agua bidestilada estéril (ml)	1.4	2.7	4.1	8.2
TAE 3X pH 6.5 (ml)	0.5	1	1.5	3
Poliacrilamida al 30% (ml)	1.1	2.2	3.25	6.5
Temed (µl)	4.2	8.3	12.5	25
Persulfato de amonio al 10% (µl)	42	83	125	250

Se disuelve la urea con calor suave y agitación

Los volúmenes de las soluciones preparadas con diferentes cámaras de electroforesis fueron: 5 ml para la 'Mighty Small II' con separadores de 0.75 mm; 10 ml para la 'Mighty Small II' con separadores de 1.5 mm, y 15 ml para la cámara acrílica de fabricación local con peine de 0.75 mm.

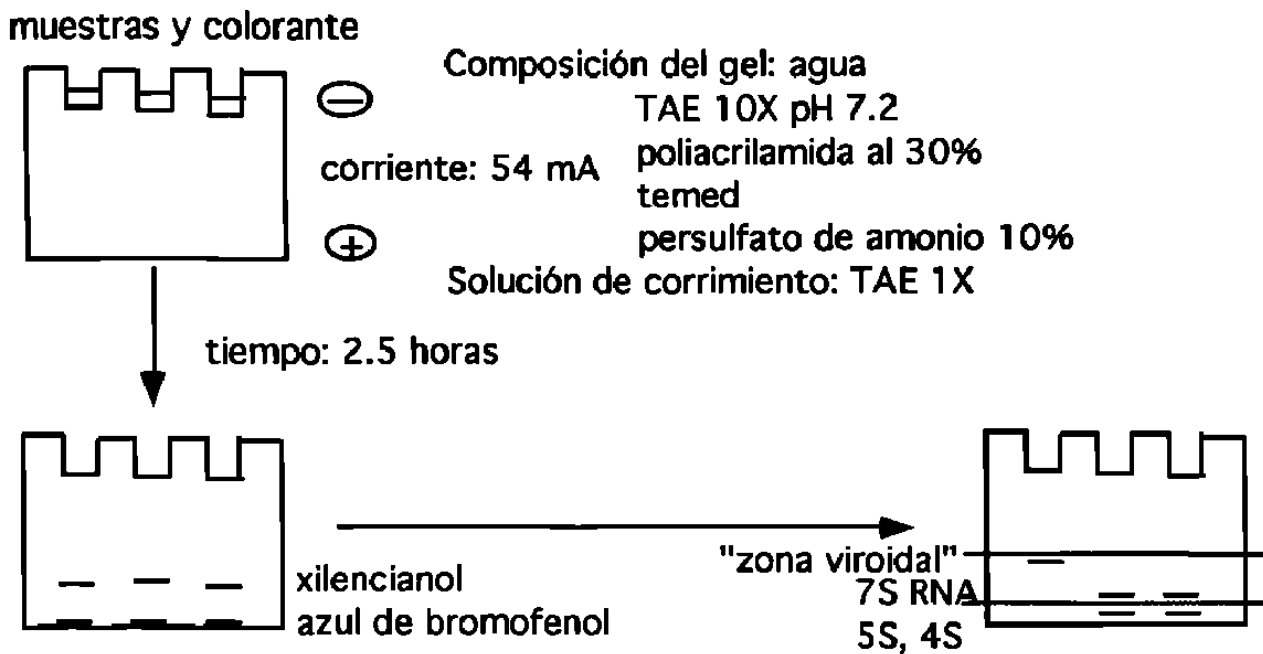
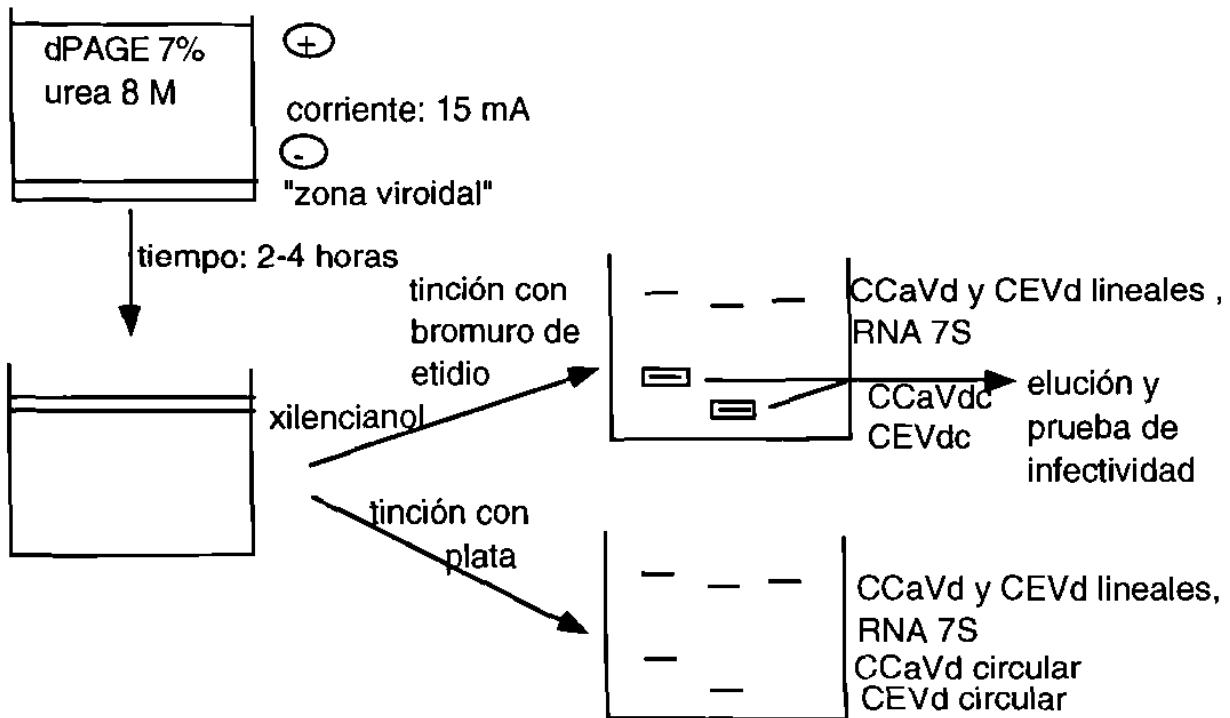


Fig. 2. Esquema con las características de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5% (1a. dirección) .

PAGE al 7% desnaturizante con urea 8 M. Una vez ensamblados los cristales y con un fragmento del gel nativo en la parte inferior, se procedió a mezclar en un vaso de precipitado las cantidades señaladas en el Cuadro 8B, se agitó la solución en una plancha magnética con calor, y una vez disuelta la urea se agregó la solución de poliacrilamida al 30%, el temed y el persulfato de amonio al 10%. Se vertió rápidamente la solución en las placas de cristal y se dejó polimerizar durante 1 hora. Se rellenaron los reservorios de la cámara electroforética con solución amortiguadora TBE 1X (Tris 22.5 mM, ácido bórico 22.5 mM y Na_2EDTA 0.5 mM) pH 8.3 y se invirtieron los electrodos aplicando corriente constante de 15 mA hasta que el xilencianol migró 1 cm abajo de la parte superior (4 horas 15 min en la cámara acrílica y 2 horas en la 'Mighty Small II'). Finalmente se removió el gel de los cristales y se tiñió (Fig. 3).



Composición del gel: urea 8 M
 agua
 TAE 3X pH 6.5
 poliacrilamida al 30%
 temed
 persulfato de amonio 10%
 Solución de corrimiento: TBE 1X pH 8.3

Fig. 3. Esquema con las características de la electroforesis en gels de poliacrilamida desnaturalizantes con urea 8 M (2a. dirección).

Tinción de gels de poliacrilamida con nitrato de plata. La tinción de los gels con nitrato de plata se realizó tomando como base el procedimiento de Igloi (1983) el cual consiste en los pasos siguientes:

1. Fijar el gel en una solución de alcohol etílico-ácido acético-agua en proporción 50-10-40 durante 60 min o toda la noche.
2. Sumergir el gel en una solución de alcohol etílico-ácido acético-agua en proporción 10-1-89 durante 60 min adicionales.
3. Teñir con nitrato de plata 12 mM (0.2%) durante 60 min.
4. Enjuagar con agua bidestilada 2 ó 3 veces.
5. Revelar con KOH 0.75 M (6.4 g KOH, 1.12 ml de formaldehido y 150 ml de agua) hasta que aparezcan las bandas.

6. Cuando fue requerido, la reacción de revelado fue parada con ácido acético al 5% o con Na_2CO_3 0.07 M.

Para la realización de las pruebas de infectividad, se eluyeron las bandas de los viroides obtenidas en el gel desnaturalizante las cuales fueron cortadas con un grosor aproximado de 5 mm y colocadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml al cual se le agregó solución amortiguadora de glicina 0.05 M y K_2HPO_4 0.03 M pH 9.2 (Morris y Smith, 1977).

3.3.2 Comparación de métodos de extracción del RNA en la detección directa. En la búsqueda de un método de extracción de RNA con mayor selectividad hacia el RNA viroidal, se compararon los 5 métodos descritos anteriormente a partir de 2 tejidos vegetales (corteza y hoja) de cidra Etrog (*Citrus medica* L.) con reacción a exocortis por la inoculación previa. Con el fin de homogenizar dicha comparación, después de la extracción original se adicionó un paso final de purificación haciendo pasar el extracto a través de una columna de celulosa CF-11 en todos los métodos. El principal criterio de comparación fue la aparición y resolución del RNA del viroide en el gel desnaturalizante, aunque también se consideró un análisis de la cantidad y calidad del RNA.

3.3.3 Validación de la técnica. Una vez establecida la técnica de electroforesis secuencial y después de definir el mejor método de extracción del RNA para la detección de viroides por electroforesis, se validó la técnica con muestras de naranja dulce de un lote de variedades del CEGET localizado en General Terán, N.L. y muestras de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán, tal y como se describió en la sección de Fuente de viroides y material vegetal.

3.4 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

3.4.1 Selección, análisis y síntesis de iniciadores (primers). Se utilizaron los iniciadores descritos por Yang y cols. (1992), un par para la amplificación del viroide exocortis y un segundo par para el viroide causante de cachexia de los cítricos, previa caracterización mediante el uso del programa computacional OLIGO versión 4.0, así como la verificación de su eficiencia mediante una simulación de PCR utilizando el programa Amplify versión 1.2 (Engels, 1993) y 18 secuencias molde del viroide

exocortis además de 34 secuencias del viroide enanismo del lúpulo las cuales fueron obtenidas por INTERNET del banco de genes (GenBank versión 105.0+, abril 1998; internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mantenido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica de la Biblioteca Nacional de Medicina dependiente del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (Apéndice).

Para el viroide exocortis se utilizó un iniciador al cual se le denominó complementario y contiene 20 bases nucleotídicas con la secuencia 5'-ccctgaaggacttctcccc-3', que es complementaria con la región 71-90 del viroide. Lo mismo se hizo con el iniciador homólogo cuya secuencia es homóloga al segmento 91-113, 5'-atccccggggaaacctggaggaag-3'.

Para el viroide cachexia se utilizó también un par de iniciadores: el complementario que contiene 20 bases que son complementarias con la región 259-278 y tiene la secuencia 5'-cgcggcagaggctcagatag-3'. El otro iniciador utilizado es homólogo con la región 279-1, y contiene 20 bases en el siguiente orden: 5'-gatcctctcttgagcccctc-3'.

Todos los iniciadores fueron sintetizados por Bio-Synthesis, Inc. (Lewisville, TX, USA) y diluidos en agua grado Mili-Q. Una amplia descripción de las características de los iniciadores y de su forma de dilución se describe en el Apéndice.

3.4.2 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide cachexia.

Síntesis del DNA complementario (cDNA). Para la síntesis del DNA complementario y su posterior amplificación, se siguieron 2 variantes conocidas como proceso acoplado o continuo y desacoplado o discontinuo con la única diferencia entre ambos en que el primero fue realizado en 2 pasos en el mismo tubo, en tanto que en el segundo se efectuaron 3 pasos en dos tubos Eppendorf de 500 µl de capacidad. Para el proceso desacoplado, se siguió el procedimiento recomendado por los fabricantes de 2 enzimas con actividad reverso transcriptasa con ligeras modificaciones: la AMV (Gibco, BRL) derivada a partir del Virus Mieloblastosis Aviar, y la M-MLV (Gibco, BRL) obtenida del Virus Leucemia Murina de Moloney. La cadena inicial del DNA (complementaria al RNA viroidal) fue sintetizada en una mezcla de reacción conteniendo 5 µg, 1 µg, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg y 1 pg de RNA total de la muestra problema (mandarino Parson's Special como testigo positivo), 20 pmoles del primer complementario (132 ng) y 4 µl de solución amortiguadora de primera cadena 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM); se calentó

el tubo a 94°C durante 3 min y se enfrió en forma inmediata en hielo por 2 min para luego colocarlo a temperatura ambiente durante 30 min adicionales. Después de este tiempo, se le agregaron 2 µl de ditionitrotol (DTT) 0.1 M y 200 unidades de la enzima M-MLV ó 5 unidades de AMV, así como una mezcla de desoxinucleósidos trifosfatados, dNTP's (Gibco, BRL) a una concentración final de 500 µM, se mezcló suavemente y se dejó incubando el tubo a 37°C durante 1 hora.

Amplificación del cDNA. Se utilizaron 2 µl del producto de la reacción anterior (cDNA) para las reacciones de PCR de 25 µl, las cuales se efectuaron con 5, 10, 20 y 40 pmoles de cada primer. La mezcla de reacción también contenía Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, dNTP's cada uno a una concentración final de 200 µM y 2.5 unidades de la enzima *Taq*-DNA polimerasa (Gibco, BRL). Al final se agregó una gota de aceite mineral para evitar la evaporación. Los programas térmicos utilizados fueron 94°C de desnaturalización, 50, 55 y 60°C de apareamiento, y 72°C de polimerización con tiempos de 1'-2'-3', 1'-2'-2', 1'-1'-1', 1'-45"-45" y 30"-30"-30" durante 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37 y 40 ciclos. Al final se dió una extensión de 72°C durante 4 min. Para las reacciones anteriores se utilizó un termociclador Perkin Elmer modelo 9700. Adicionalmente, se evaluó la capacidad de amplificación por PCR utilizando RNA extraído por los 5 métodos mencionados con anterioridad.

Alternativamente al procedimiento desacoplado, se realizaron reacciones de RT-PCR continuo o acoplado en un mismo tubo en dos pasos: en el primer paso se mezclaron el RNA, el iniciador complementario y la solución amortiguadora de primera cadena, se calentó y se enfrió bajo las mismas condiciones que el proceso descrito. En el segundo paso se agregaron todos los demás componentes tanto de síntesis de cDNA como de PCR programando 37°C durante 60 min acoplado a un programa térmico de 94-55-72 °C durante 30"-30"-30" por 30 ciclos.

Una alícuota de los productos de amplificación de 6 µl fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa (Sigma) al 1.3% (1 hora 100 V) o en un gel de poliacrilamida al 5% (1 hora a 54 mA) utilizando TBE 0.5X (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM y Na₂EDTA 1 mM) como amortiguador de corrida y para elaborar el gel (Sambrook y cols., 1989), ambos geles fueron subsecuentemente teñidos con 1.5 µl de una solución de bromuro de etidio concentrada a 10 µg/ml y visualizados en un transiluminador con luz ultravioleta Fotodyne. Finalmente los geles fueron fotografiados con una cámara Fotodyne-Polaroid, FCR-10, provista de película Polaroid 667 instantanea.

3.4.3 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide exocortis. Utilizando como testigo positivo RNA extraído de cidra inoculada con el viroide exocortis y con reacción de epinastia foliar, se procedió a probar la eficiencia de los iniciadores sintetizados. De acuerdo con la experiencia obtenida con el uso de los iniciadores para cachexia como punto de partida, se usó la reacción desacoplada y el programa térmico 94-55-72, 45"-45"-45" durante 31, 34, 37 y 40 ciclos, posteriormente se probaron 50 y 60°C de apareamiento para conocer el margen térmico de amplificaciones. El resto de las condiciones de reacción fueron aquellas que resultaron más exitosas en el caso de cachexia.

3.4.4 Validación de la técnica. Para comprobar la confiabilidad en la técnica establecida, se probó su reproducibilidad con muestras de árboles de naranjo dulce y limón Persa de las diferentes localidades descritas anteriormente.

3.5 Ensayo de hibridación por mancha de punto (dot blot)

Se utilizó una membrana comercial de nylon de Agdia, Inc. en la cual se colocaron extractos de RNA total obtenidos por 5 métodos a partir de muestras de cidra Etrog inoculada con exocortis y cargando con 800 ng de RNA total, excepto en el caso del método de Pallás y cols. (1987), en el cual debido a la baja concentración de ácidos nucleicos, se cargó con sólo 300 ng. El proceso de la hibridación y revelado se hizo en la compañía referida.

3.6 Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad

Para comprobar la infectividad de los viroides detectados por RT-PCR y sPAGE, así como para su conservación *in planta*, se inocularon mecánicamente las plantas herbáceas y leñosas mencionadas en la sección de Fuente de viroides y material vegetal, utilizando yemas vegetativas y RNA total de las muestras de limón Persa y naranjo dulce, así como el viroide exocortis eluido a partir del gel de poliacrilamida.

Para la inoculación de las plantas herbáceas pepino y tomate, se introdujeron las preparaciones de ácidos nucleicos mediante una punción en el hipocotilo con un palillo de dientes impregnado del inóculo, ésto fue realizado en el momento de la emergencia de las primeras hojas verdaderas. Después de 3 semanas las plantas

fueron podadas a 2 ó 3 nudos y se removió todo el follaje, y después de otras 3 semanas se colectó el rebrote para extracción del RNA (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Semancik y cols., 1988a, 1988b). Este bioensayo fue repetido 2 veces inoculando en cada ocasión 4 plantas de pepino y 4 de tomate con RNA de cada localidad de muestreo, y de estas 4 plantas sólo 2 fueron seleccionadas para la extracción de ácidos nucleicos y detección de viroides. Para el caso de la banda de exocortis recuperada del gel de poliacrilamida, se siguió el procedimiento de Morris y Smith (1977) el cual consiste en recortar el pedazo del gel en rebanadas y molerlo con un pistilo en 500 µl de solución amortiguadora de glicina 0.05 M y K₂HPO₄ 0.03 M, pH 9.2.

La inoculación de las plantas leñosas (cidra, naranjo agrio, mandarino Cleopatra, naranjo Pineapple y citrange Troyer) se hizo por injerto de yema, el cual se dejó crecer y a los 8 meses después del injerto se muestrearon para la extracción del RNA y para la detección de viroides. En este bioensayo se inocularon 20 plantas de cada una de las 5 especies anteriores con yemas de diferentes localidades de muestreo dando un total de 100 plantas de las cuales sólo fueron analizadas 40.

En todos los casos se hicieron observaciones periódicas y se realizaron extracciones de RNA de las plantas herbáceas y leñosas inoculadas, para la comprobación de la transmisión por RT-PCR o por sPAGE.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Extracción del RNA

Las cantidades de RNA total (genómico y viroidal) obtenidas y sus promedios por método en diferentes tejidos vegetales y especies de cítricos se presentan en el Cuadro 9. Cabe señalar que en los 5 métodos de extracción utilizados se partió de diferentes cantidades de tejido vegetal tal y como se describió en el capítulo de Materiales y Métodos, pero se hicieron conversiones a los datos originales para mostrar los rendimientos de RNA equivalentes a un gramo de tejido en todos los métodos.

Cuadro 9. Rendimiento estimado del RNA total ($\mu\text{g g}^{-1}$) extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos.

Método\Muestra	1	2	3	4	Promedio
Pfannenstiel y cols. (1980)	96	82	71	84	83
Chomczynski y Sacchi (1987)	43	36	60	73	53
Pallás y cols. (1987)	89	17	96	100	76
Yang y cols. (1992)	90	117	86	68	90
Lee (1995)	100	81	180	159	130

¹Corteza de cidra

²Corteza de cidra

³Hojas de cidra

⁴Corteza de limón Persa

Al observar los rendimientos individuales del RNA total en cada muestra, se puede ver una consistencia relativa al menos entre las muestras 1, 3 y 4 procesadas por los 5 métodos descritos, ya que la muestra 2 (corteza de cidra) tiene valores del rendimiento de RNA inferiores a las otras 3 muestras en varios de los métodos de extracción realizados; también se puede ver que el mayor diferencial de rendimiento entre métodos se observa en la muestra 3 (hojas de cidra), con un cálculo de $120 \mu\text{g}$ de RNA total por gramo de tejido ($\mu\text{g g}^{-1}$) mismo que se obtiene de la diferencia entre el mayor rendimiento del RNA (Método de Lee, 1995) y el de menor rendimiento (Método de Chomczynski y Sacchi, 1987). Una cantidad de esta magnitud puede ser de gran importancia en pruebas de detección considerando que en forma natural el

RNA del viroide se encuentra a muy baja concentración en la planta, como es el caso del HSVd y del viroide causante del moteado amarillo de la vid (GYSVd), en los cuales Staub y cols. (1995) estimaron en 2 y 8 ng de viroide respectivamente en 40 μg de RNA total extraído a partir de 1 g de tejido de vid.

Al comparar los métodos de extracción en la columna que contiene los valores promedio de 4 observaciones (Cuadro 9), el método de Lee (1995) resultó superior a los otros, ya que se obtuvieron 130 μg de RNA total por gramo de tejido ($\mu\text{g g}^{-1}$), seguido por el método de Yang y cols. (1992) con 90 $\mu\text{g g}^{-1}$. Los métodos de Pfannenstiel y cols. (1980), y Pallás y cols. (1987) tuvieron un rendimiento promedio similar e intermedio en magnitud (83 y 76 $\mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente); en tanto que con el método de Chomczynski y Sacchi (1987) se obtuvieron en promedio 53 $\mu\text{g g}^{-1}$ que fue la cantidad menor de los métodos evaluados, aunque como se verá más adelante esto no impidió que se obtuvieran resultados aceptables tanto en la detección directa por electroforesis secuencial como en hibridación al utilizar extractos recuperados por este método.

A pesar de la importancia de conocer un método más eficiente que incremente la selectividad del RNA viroidal con respecto al RNA total, existen pocos reportes al respecto, ya que solamente se cuenta con pocos datos cuantitativos de RNA total y estimaciones de RNA viroidal, ninguno de éstos en cítricos. Staub y cols. (1995) obtuvieron de 20 a 60 μg de RNA total por gramo de tejido ($\mu\text{g g}^{-1}$) en vid y 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ en pepino, valores un poco menores a los estimados en este trabajo. Valores superiores a los anteriores han sido obtenidos por Morris y Smith (1977) en papa (200 $\mu\text{g g}^{-1}$), y por Wan Chow Wah y Symons (1997) en vid (250-350 $\mu\text{g g}^{-1}$). En este sentido es importante señalar que el rendimiento del RNA total, además del método de extracción y de la especie, es influido por un gran número de factores entre los que se pueden mencionar la edad, estado fisiológico de la planta, el tipo de tejido (Staub y cols., 1995), la manipulación, y en este caso particular, la purificación en celulosa.

En cuanto a la calidad del RNA, un parámetro analizado fue la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm la cual debe estar entre 1.8 y 2.0 para ser considerado de buena calidad (Sambrook y cols., 1989; Staub y cols., 1995), ya que frecuentemente el RNA viene mezclado con proteínas y otras sales. Este requisito sólo fue logrado con el método de Yang y cols. (1992), el cual tuvo una relación

promedio de absorbancias de 1.8, en tanto que los otros métodos dieron valores individuales menores, entre 1.0 y 1.7 (Cuadro 10).

Cuadro 10. Relación de absorbancias 260/280 nm obtenidas en RNA extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos.

Método\Muestra	1	2	3	4	Promedio
Pfannenstiel y cols. (1980)	1.1	1.1	1.0	1.1	1.1
Chomczynski y Sacchi (1987)	1.7	1.1	1.1	1.1	1.3
Pallás y cols. (1987)	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2
Yang y cols. (1992)	1.7	1.9	2.1	1.5	1.8
Lee (1995)	1.0	1.7	1.5	1.3	1.4

¹Corteza de cidra

²Corteza de cidra

³Hojas de cidra

⁴Corteza de limón Persa

En la Figura 4 se muestra una fotografía de un gel de agarosa al 0.8% conteniendo una alícuota de los extractos obtenidos con los 5 métodos a partir de una muestra de corteza de cidra Etrog. Se tuvo éxito en la extracción del RNA ribosomal 28S y 18S con los 5 métodos aplicados, lo cual es considerado por Semancik (1991) como un indicador de una buena manipulación. En la Figura 4 también se muestra la cantidad de RNA colocada por carril según la estimación hecha por espectrofotometría. Existe una coincidencia parcial entre lo observado y lo estimado, ya que las muestras aplicadas en los carriles 4 y 5 tienen mayor concentración con ambos criterios, y el RNA aplicado en el carril 2 tiene la menor concentración; sin embargo, lo observado en el carril 3 no corresponde totalmente con lo estimado puesto que aparenta menor cantidad de RNA que lo estimado (1084 ng). La estimación de la concentración de RNA por la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio es considerado por algunos autores (Sambrook y cols., 1989) como la medición más precisa de calidad y cantidad del RNA, con mayor razón cuando hay impurezas como proteínas y fenol, puesto que es una observación directa aunque tiene la desventaja de ser un carácter estrictamente visual. Es importante señalar que los 5 métodos arriba reportados fueron evaluados en 6 muestras adicionales (repeticiones) con resultados similares.

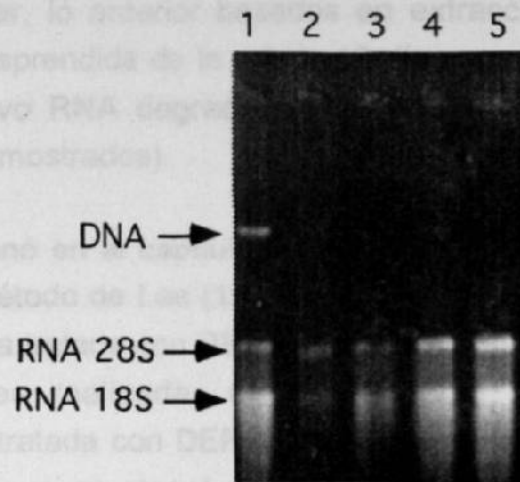


Fig. 4. RNA obtenido por 5 métodos de extracción a partir de corteza de cidra Etrog visualizado en un gel de agarosa al 0.8%. Cantidad de RNA aplicada por carril y por método: 1. 600 ng de RNA, Yang y cols. (1992); 2. 348 ng, Chomczynski y Sacchi (1987); 3. 1084 ng, Pfannenstiel y cols. (1980); 4. 1080 ng, Pallás y cols. (1987); 5. 1772 ng, Lee (1995).

Los elementos revisados hasta el momento parecen indicar que los métodos de Yang y cols. (1992) y de Lee (1995) reúnen un mayor número de atributos de calidad y cantidad de RNA para los fines deseados; sin embargo, de éstos, el método de Yang y cols. (1992) aparece con DNA contaminante, el cual se observa en el gel de agarosa (Fig. 4 carril 1) y puede ser desfavorable al interferir con el RNA en la visualización de los viroides.

En virtud de que dos de los métodos utilizados recomiendan una elución en etapas (Lee, 1995 y Pallás y cols., 1987), se analizó esta posibilidad con una segunda, tercera y cuarta elución. De acuerdo con las cuantificaciones espectrofotométricas realizadas, la mayor parte del RNA es liberado en la primera elución y ocasionalmente se puede recuperar otra pequeña cantidad en la segunda elución, por lo que se considera mejor aumentar un poco el volumen de la solución amortiguadora en la primera elución y eliminar la segunda. En ambos métodos, la tercera y cuarta elución parecen innecesarias.

Para conocer la duración de conservación y almacenamiento de varetas, se realizaron pruebas de extracción del RNA de corteza de muestras de limón Persa colectadas en el estado de Tabasco y procesadas a los 1, 20, 40 y 60 días después de la colecta, manteniéndose almacenadas a 6°C. En todos los casos se obtuvo buena cantidad y calidad del RNA siempre y cuando se mantuvo la vareta completa,

es decir sin descortezar, lo anterior basados en extracciones ocasionales que se hicieron con corteza desprendida de la vareta 15 días o más, previos a la extracción, en las cuales se obtuvo RNA degradado a pesar de mantener las muestras en refrigeración (datos no mostrados).

Como se mencionó en el capítulo de Materiales y Métodos, cada extracto de RNA obtenido con el método de Lee (1995) fue dividido en 2 fracciones, una de ellas fue almacenada en agua tratada con DEPC y la otra en etanol salado, ambas a -20°C . Con las observaciones realizadas en este trabajo, se apreció que el RNA resuspendido en agua tratada con DEPC pudo conservarse hasta 3 meses sin sufrir degradación, en tanto que en etanol salado se ha mantenido hasta por más de 2 años sin cambio aparente (datos no mostrados), esto último también fue observado por Wan Chow Wah y Symons (1997) con RNA extraído de vid.

En términos generales los 5 métodos utilizados para la extracción del RNA tienen mucha similitud y la principal diferencia entre éstos radica en la solución amortiguadora de lisis celular, la cual en el caso del método de Pfannenstiel y cols. (1980) contiene principalmente cloruro de litio para precipitar los ácidos nucleicos de bajo peso molecular. La solución descrita por Chomczynski y Sacchi (1987) se caracteriza básicamente por el uso de tiocianato de guanidina y citrato de sodio; en tanto que Pallás y cols. (1987) recomiendan el uso de Trizma base y ácido de etilendiaminotetracético sal disódica (Na_2EDTA). Por su parte, Yang y cols. (1992) y Lee (1995) formularon su solución de lisis a base de glicina y cloruro de sodio principalmente. Además del procedimiento base de extracción, algunos métodos como el de Lee (1995), Pallás y cols. (1987), Semancik (1991), y Yang y cols. (1992), incorporan al final de la extracción un paso adicional de purificación del RNA en columnas de celulosa, el cual hace más selectiva la extracción disminuyendo el RNA total y aumentando la proporción de RNAs de bajo peso molecular, ya que estos RNAs mezclados con etanol al 25% tienen afinidad por la celulosa y pueden ser recuperados por elución en una solución amortiguadora sin etanol. Además la cromatografía en celulosa es un procedimiento preparativo para la remoción de DNA y otros compuestos pigmentados (Semancik, 1991). Para uniformizar la comparación cuantitativa entre los 5 métodos de estudio, se purificó el RNA total en una columna de celulosa de fibra mediana, CF-11 (Sigma, cat. C-6288) en todos los casos.

4.2 Análisis del RNA por electroforesis en geles de poliacrilamida

4.2.1 Establecimiento de la técnica. Para el establecimiento de la técnica de electroforesis secuencial (sPAGE) se utilizaron aislamientos semipurificados de la colección de la Universidad de Florida conteniendo los viroides exocortis, cachexia o ambos, los cuales causan las enfermedades que llevan los mismos nombres. También se usó como testigo el viroide causante del enanismo en el crisantemo (el cual tiene una talla molecular similar al viroide exocortis) y un testigo sano. Los aislamientos utilizados con sus claves originales fueron: 2094 testigo sano, 2095 E16B, 2158 Xylo-902, 2169 Xylo-82DR, 2360 CSV, E10, E21A, E21, E13, 0100 y E9.

Después de varios ensayos con diferentes factores de variación se implementó y optimizó la técnica sPAGE con las siguientes características: Con respecto a la preparación del gel nativo y la separación del RNA en éste, se estableció el procedimiento descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, el cual dió resultados aceptables pero notorios hasta que se realizó la re-separación del RNA en un segundo gel, ya que al teñir el gel nativo con las muestras testigo mencionadas, se obtuvo un enorme número de bandas, algunas muy cercanas entre sí lo que hizo imposible la identificación de alguna banda que pudiera asociarse con los viroides en estudio debido a la mezcla entre moléculas de RNA vegetal y viroidal. Algo similar está documentado por Boccardo y cols. (1984) y Flores (1988) quienes atribuyen esto a una posible presencia de polifenoles y polisacáridos los cuales interfieren con la visualización de las bandas viroidales. También algunos RNAs hospederos como el 7S por ejemplo, pueden ocasionar un enmascaramiento del viroide cachexia en el gel debido a que tiene una migración semejante a la de este viroide (Semancik y cols., 1988a, 1988b). Por lo anterior y basados en la migración del colorante xilencianol el cual se sabe que co-migra con el viroide exocortis (Lee, 1995; Semancik, 1991), se hicieron cortes del pedazo del gel al nivel del colorante xilencianol (1 cm) adicionado de 0-1 cm abajo y 0-1 cm arriba (1-3 cm en total) lográndose resultados aceptables con un trozo del gel de 2 cm que corresponde a 1 cm del colorante y 0.5 cm arriba y abajo. No existió mucha diferencia entre el uso de geles de 0.75 y 1.5 mm de grosor puesto que en ambos geles se tuvo buena resolución de los viroides estudiados, con la diferencia de que los geles más delgados fueron más frágiles a la manipulación.

La aplicación de urea 8 M al gel desnaturizante en la sPAGE permitió una migración discreta entre el RNA lineal y el RNA circular; en el caso del primero se

observa en la Figura 5 una mezcla de RNAs hospedero y viroidales lo cual no ocurrió en el caso del RNA circular debido a la baja concentración de RNAs con esa conformación en el hospedero (Semancik, 1988). Al correr el gel en orden ascendente (segunda dirección) tal como fue descrito originalmente por Schumacher y cols. (1983), quedaron los viroides de mayor talla molecular (CEVd y CSVd) aprox. 1 cm arriba del borde inferior del gel; y el viroide cachexia quedó más arriba, pero abajo de los RNAs lineales; esto es debido a que el RNA de forma circular se desplaza más lentamente (comparado con las formas lineales) entre los poros que existen en las moléculas de poliacrilamida (Boccardo y cols., 1984). La migración diferencial entre los RNAs de formas circulares y lineales está determinada además de la urea, por el gradiente de pH entre la solución de corrimiento y la solución constitutiva del gel (Rivera-Bustamante y cols., 1986). En este caso se utilizó la solución TAE 1X pH 6.5 para preparar el gel, y la solución TBE 1X pH 8.3 para el corrimiento. No es recomendable aumentar la corriente por encima de 15 mA para una separación más rápida del RNA, ya que se eleva mucho el voltaje (hasta más de 400 voltios) y se calienta la solución amortiguadora pudiendo causar daños al RNA (Moreno-Mata, 1995). De hecho una intensidad de la corriente de 15-16 mA es la utilizada comunmente para separar viroides en geles de poliacrilamida desnaturizantes (Duran-Vila y cols., 1991, 1993; Lee, 1995; Schumacher y cols., 1983; Semancik, 1991; Semancik y Harper, 1984).

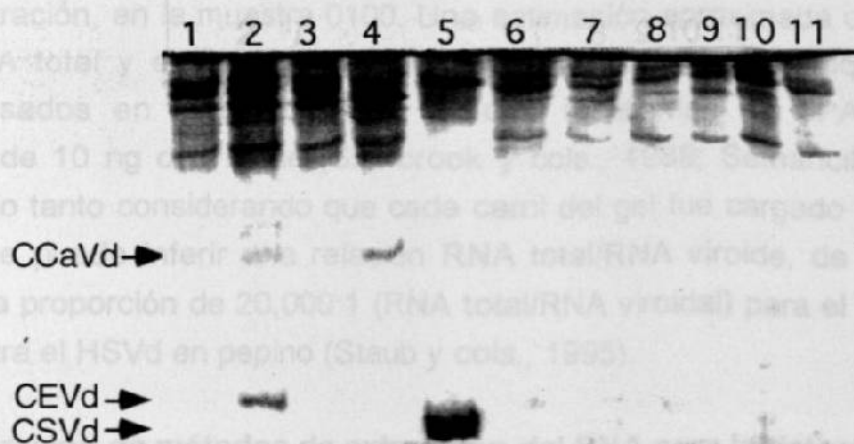


Fig. 5. Electroforesis secuencial en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturizante (urea 8 M) con aislamientos de viroides semipurificados. Carril 1. 2094 testigo sano, 2. 2095 E16B, 3. 2158 xylo-902, 4. 2169 xylo-82DR, 5. 2360 CSVd, 6. E10, 7. E21A, 8. E21, 9. E13, 10. 0100 y 11. E9. Se cargó con 4-10 μ g RNA por carril. Las flechas indican las posiciones de las formas circulares de los viroides cachexia (CCaVd), exocortis (CEVd) y enanismo del crisantemo (CSVd).

Con respecto a la fijación del gel, la combinación de etanol-ácido acético-agua en proporciones de 50-10-40 durante 60 min o toda la noche recomendada por Igloi (1983) fue un poco severo para los geles, causando una deshidratación excesiva y cambio de apariencia, y ocasionalmente los dañó en forma irreversible por lo que al probar la mezcla 40-10-50 dió mejores resultados y se pudo reutilizar la solución una vez.

Al igual que Gillings y cols. (1988), con excepción de la muestra No. 2360, la cual contenía una elevada concentración del viroide enanismo del crisantemo, ningún otro viroide fue detectado por tinción con bromuro de etidio, por lo que para la recuperación de la forma infectiva (circular) fue necesario correr muestras duales y teñir una repetición con nitrato de plata. También se observó que una misma solución de nitrato de plata 12 mM permitió un buen revelado de hasta 3 geles.

El gel observado en la Figura 5 permitió conocer la movilidad de los viroides CEVd, CCaVd y CSVd, además de complementar la información que se tenía de estas muestras. La muestra No. 2095 E16B resultó con una mezcla de los viroides CEVd y CCaVd, en tanto que las muestras No. 2158 xylo-902 y No. 2169 xylo-82DR solamente contenían CCaVd. Aún y cuando en la misma fotografía no parece observarse ningún viroide en los carriles 6, 7, 8, 9, 10 y 11, en el gel original si se vió la presencia de CEVd en todos ellos, y de ambos viroides (CEVd y CCaVd) aunque a baja concentración, en la muestra 0100. Una estimación aproximada de la proporción entre el RNA total y el RNA del viroide puede hacerse con cualquiera de estos testigos, basados en la aseveración de que la técnica de sPAGE tiene una sensibilidad de 10 ng de viroide (Sambrook y cols., 1989; Semancik y Duran Vila, 1991) y por lo tanto considerando que cada carril del gel fue cargado con 4-10 µg de RNA total, se puede inferir una relación RNA total/RNA viroide, de 1000:1. Se ha estimado una proporción de 20,000:1 (RNA total/RNA viroidal) para el HSVd en vid, y de 1000:1 para el HSVd en pepino (Staub y cols., 1995).

4.2.2 Comparación de métodos de extracción del RNA para la detección directa de viroides por electroforesis secuencial (sPAGE). Una vez establecida la técnica de electroforesis secuencial con los testigos semipurificados como se mostró en la sección previa, se probó su aplicación en la comparación de 5 métodos de extracción del RNA en dos tejidos vegetales (hoja y corteza) a partir de cidra Etrog previamente inoculada con el viroide exocortis de los cítricos.

En las Figuras 6A y 6B puede apreciarse la detección del viroide exocortis en las muestras obtenidas por los 5 métodos evaluados con una menor intensidad de la banda correspondiente a la forma circular del viroide exocortis en los carriles cargados con RNA extraído por el método de Pallás y cols. (1987). Estas diferencias en la concentración del viroide no pueden atribuirse totalmente al método de extracción usado debido a un margen dado por las imprecisiones en la estimación de la concentración del RNA. El RNA extraído de hoja y de corteza de cidra tuvieron el viroide exocortis en concentraciones capaces de ser detectadas por sPAGE. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos por La Rosa y cols. (1988), quienes encontraron que la detección de exocortis por sPAGE en cidra mantenida en invernadero es igualmente efectiva utilizando hojas tiernas o corteza, a diferencia de cuando se parte de muestras de campo en donde los mismos autores recomiendan el uso preferencial de corteza. La detección del viroide exocortis por sPAGE era de esperarse considerando que la cidra es una especie vegetal capaz de hospedar y mantener al viroide exocortis en altas concentraciones (Duran-Vila y cols., 1991, 1993; Flores, 1988; Gillings y cols., 1988; La Rosa y cols., 1988; Roistacher y cols., 1977).

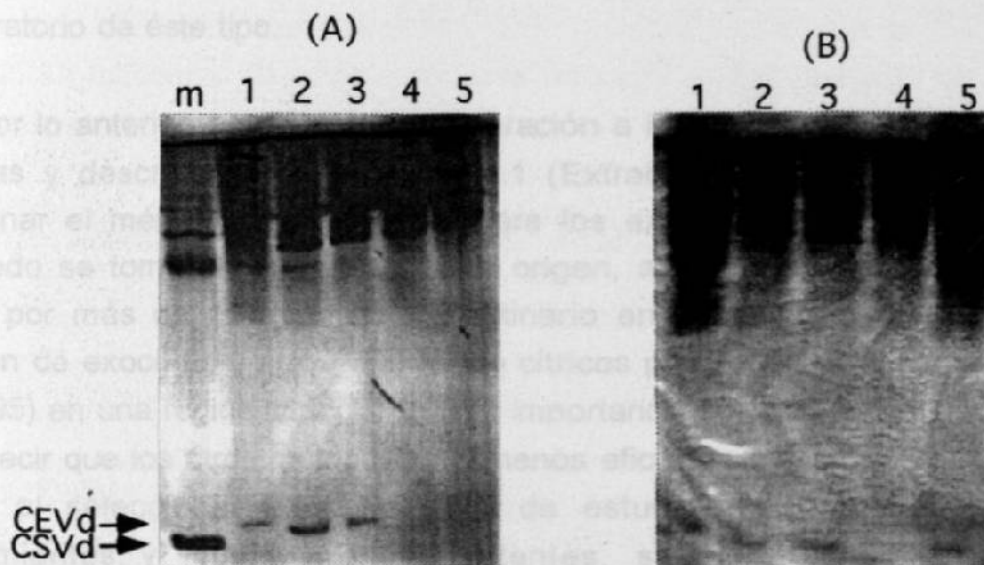


Fig. 6. Comparación de 5 métodos de extracción del RNA en la sensibilidad de detección del viroide exocortis en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M) cargado con 15 μ g de RNA obtenido de muestras de hoja (A), y 10 μ g de RNA de corteza (B) de cidra Etrog previamente inoculada. m, CSVd. 1. Yang y cols. (1992); 2. Chomczynski y Sacchi (1987); 3. Pfannenstiel y cols. (1980); 4. Pallás y cols. (1987); y 5. Lee (1995).

La variación en la cantidad de RNA extraído con diferentes métodos, misma que fue señalada con anterioridad, puede hacer la diferencia en la sensibilidad de detección, ya que si las proporciones de RNA total/RNA viroide fueran similares en los 5 métodos, aquel método capaz de lograr la mayor cantidad de RNA en la extracción podría ser el más seguro para detección mediante la técnica sPAGE.

Comparando los 5 métodos de extracción aplicados en muestras de cidra Etrog bajo el criterio de detección del viroide exocortis por sPAGE, no se puede señalar una superioridad absoluta de alguno de ellos, puesto que con los 5 métodos se visualizó el viroide en el gel con una intensidad semejante, excepto las muestras extraídas por el método de Pallás y cols. (1987) las cuales mostraron una menor concentración del viroide en ambos tejidos vegetales (hoja y corteza). Con respecto a la simplicidad y tiempo de extracción, factores que determinan la velocidad de procesamiento de muestras, también existe similitud en los 5 casos ya que el procedimiento general es muy parecido en los métodos de estudio y tiene una duración aproximada de 9-10 horas incluyendo la purificación del RNA en columnas de celulosa; tampoco los reactivos y soluciones involucradas en el procedimiento parecen limitar algún método, puesto que se requieren reactivos de uso rutinario en los laboratorio de éste tipo.

Por lo anterior, se dió mayor ponderación a las concentraciones de RNA total obtenidas y descritas en el apartado 4.1 (Extracción del RNA) al momento de seleccionar el método de Lee (1995) para los experimentos subsecuentes, pero sobre todo se tomó en consideración el origen, aplicación y persistencia de este método por más de 10 años de uso rutinario en la extracción del RNA para la detección de exocortis y otros viroides de cítricos por sPAGE (Baksh y cols., 1984; Lee, 1995) en una región citrícola de gran importancia como es Florida, E.U. Esto no quiere decir que los otros métodos sean menos eficientes, de hecho al inicio de este trabajo, al seleccionar los 5 métodos de estudio entre un gran número de procedimientos y modificaciones existentes, se dió preferencia a métodos relacionados con la aplicación y especies vegetales de interés, de tal forma que por ejemplo, el método de Pfannenstiel y cols. (1980) fue originalmente establecido con el objetivo de determinar PSTVd por sPAGE; en el caso del método de Pallás y cols. (1987) fue diseñado también para la detección de un viroide por sPAGE, el HSVd a partir de lúpulo; posteriormente el método fue adoptado por Flores y Liácer (1988) para la detección del viroide causante del mosaico latente del duraznero, y por Ochoa (1995) para exocortis de los cítricos en Venezuela, ésto refleja la versatilidad del

método en cuanto a especies vegetales. El método descrito por Chomczynski y Sacchi (1987) tiene todavía mayor amplitud de aplicación ya que fue establecido originalmente para extracción de RNA a partir de tejidos y líneas celulares cultivadas de ratas y humanos. El otro método evaluado (Yang y cols., 1992) ha sido utilizado recientemente (Levy y Hadidi, 1993) para la detección de los viroides exocortis y cachexia, pero utilizando la técnica RT-PCR la cual debido a la sensibilidad que tiene, es menos requisitosa de grandes cantidades de RNA total.

4.3 RT-PCR

Debido a que el procedimiento para la síntesis del cDNA de los viroides cachexia y exocortis ya fue descrito en el capítulo de Materiales y Métodos, a continuación se referirá exclusivamente a los resultados obtenidos con la reacción en cadena de la polimerasa.

4.3.1 Cachexia. Como primer experimento se evaluaron 3 temperaturas de apareamiento con los siguientes programas térmicos: 94-50-72, 94-55-72 y 94-60-72 (°C de desnaturalización, apareamiento y polimerización) y tiempos de 1'-2'-3' durante 40 ciclos. Se utilizaron 20 pmoles de cada iniciador y RNA extraído de mandarino Parson's Special inoculado con el viroide cachexia, y los testigos xylo-902 y xylo-82DR. Se logró una amplificación aceptable del cDNA con las 3 temperaturas de apareamiento evaluadas obteniéndose un producto de 300 pares de bases (pb), otro de 400 pb y un tercer producto de 600 pb aprox. (Fig. 7). A primera vista lo anterior podría parecer una falta de especificidad de los iniciadores, pero analizando los valores de los fragmentos encontrados se puede notar que 600 es múltiplo de 300 indicando que este fragmento puede corresponder a la amplificación de formas diméricas del viroide lo cual ya ha sido reportado en los viroides causantes del manchado de fruto de la manzana, ASSVd (Hadidi y Yang, 1990), y cachexia de los cítricos (Yang y cols., 1992).

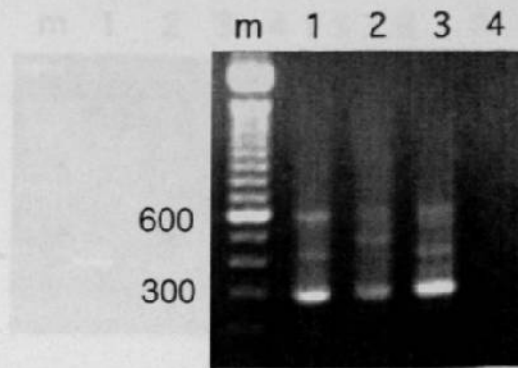


Fig. 7. Amplificación del cDNA del viroide cachexia visualizado en un gel de agarosa al 1.3%. m. Marcador de peso molecular, 1. RNA de mandarina Parson's Special, 2. xylo-902, 3. xylo-82DR, 4. control sin cDNA.

En seguida se modificaron los tiempos de desnaturalización, apareamiento y polimerización con el objetivo de buscar un acortamiento en el tiempo de la reacción. Se obtuvo éxito en todos los tiempos probados, es decir hubo buena amplificación con los tiempos: 1'-2'-2', 1'-1'-1', 1'-45"-45", y hasta con 30"-30"-30", por lo que se seleccionó este último para las reacciones posteriores por ser el de menor duración sin verse afectada la intensidad ni la definición de la banda amplificada, por el contrario la reducción de tiempos eliminó la amplificación de dímeros y trímeros que se tuvo originalmente con el programa 1'-2'-3'. Lo anterior representa en forma práctica un ahorro del 50% en el tiempo de la reacción en cadena de la polimerasa, reduciéndose de 4 horas a 2 horas y por lo tanto se reduce también el tiempo de diagnóstico.

Por otra parte, se encontró que usando el 8% del producto de la RT (2 μ l de cDNA) fue posible tener una buena amplificación a partir del ciclo 22; sin embargo, esto no siempre fue reproducible y la intensidad de la banda en ocasiones fue tenue lo que llevó a seleccionar el uso rutinario de 34 ciclos. A este respecto, aparentemente altas concentraciones del viroide en el RNA total producen una elevada síntesis de cDNA y por lo tanto, 22 ciclos térmicos son suficientes para visualizar el producto amplificado, lo cual no ocurre cuando se presentan bajas concentraciones del viroide en donde es necesario dejar 34 ciclos de amplificación. Al tratar de conocer la sensibilidad del método RT-PCR y después de 3 repeticiones, se obtuvo una amplificación visible hasta con 100 ng de RNA total, aunque se tuvo mejor resolución con 5 y 1 μ g, y no se tuvo éxito con cantidades inferiores bajo las condiciones descritas (Fig. 8).



Fig. 8. Amplificación del cDNA del viroide cachexia sintetizado a partir de diferentes concentraciones de RNA y visualizado en un gel de poliácridamida al 5%: m. Marcador de peso molecular. 1. 5 μ g, 2. 1 μ g, 3. 100 ng, 4. 10 ng, 5. 1 ng, 6. 100 pg, 7. 10 pg y 8. 1 pg de RNA total. Las flechas señalan un fragmento de 298 pb.

La sensibilidad obtenida en la detección del viroide cachexia (100 ng) es la mitad de la sensibilidad obtenida (50 ng) para el viroide achaparramiento del lúpulo por Staub y cols. (1995), y es mucho menor que la obtenida por Yang y cols. (1992) también para cachexia (100 pg) y para exocortis (1 pg). En vid, Wan Chow Wah y Symons (1997) lograron una sensibilidad máxima de 16 pg para la amplificación del viroide moteado amarillo (GYSVd). Lo anterior confirma la dependencia de múltiples factores para la amplificación de viroides.

Con respecto a la cantidad de iniciadores requerida para la reacción, aún y cuando se tenían resultados aceptables con el uso de 20 pmoles, se evaluó la adición de 5, 10, 20 y 40 pmoles de cada iniciador a la mezcla de reacción, obteniéndose una amplificación favorable en los 4 casos por lo cual se decidió seguir usando 5 pmoles en reacciones posteriores. No hubo diferencias notables entre el uso de las enzimas con actividad reverso transcriptasa AMV y M-MLV, ni tampoco entre el uso del RNA obtenido por los 5 métodos de extracción mencionados anteriormente, puesto que en todos ellos se obtuvo una amplificación aceptable, contrario a lo que se esperaba, ya que se sabe que residuos de cloruro de litio que pudieran encontrarse en los extractos obtenidos por el método de Pfannenstiel y cols. (1980) inhiben la actividad de la enzima *Taq* DNA polimerasa (Sambrook y cols., 1989), lo cual no ocurrió en este caso; existen también reportes que compuestos fenólicos y polisacáridos tienen un efecto similar (Wan Chow Wah y Symons, 1997). Adicionalmente se ha reportado la inhibición de la amplificación del viroide exocortis por residuos de acetato de potasio-SDS usados en otros métodos de extracción (Tessitori y cols., 1996).

Todo lo anterior fue evaluado en un proceso desacoplado, es decir en forma independiente entre las reacciones de reverso transcripción y PCR; sin embargo, al realizar las dos reacciones en forma continua o acoplada también fue posible amplificar al cDNA del viroide cachexia lo cual es más comodo y rápido, pero el producto de PCR se obtiene más contaminado con otros componentes de reacción lo cual trae como consecuencia una menor definición del producto amplificado. Lo anterior no quiere decir que el proceso desacoplado sea mejor sino que es necesario un estudio específico sobre las condiciones de reacción del proceso acoplado ya que muchas variables pueden afectar su resultado (Mallet y cols., 1995). Existe otra modalidad del PCR conocida como 'multiplex' la cual ha sido aplicada en cítricos con la intención de amplificar dos viroides a la vez, sin embargo, Tessitori y cols. (1996) encontraron una merma en los rendimientos obtenidos de cada viroide amplificado al ser visualizados en un gel.

4.3.2 Exocortis. Se tuvo éxito desde la primer reacción de amplificación probada con RNA molde de cidra inoculada con exocortis y sus iniciadores específicos, utilizando el programa térmico 94-55-72, 45"-45"-45" durante 34 ciclos además del resto de las condiciones descritas para el viroide cachexia. Igualmente se presentó una amplificación con temperaturas de apareamiento de 50 y 60°C lo cual indica una versatilidad térmica de la reacción, sin embargo, la intensidad del producto de PCR (370 pb aprox.) en ningún caso fue mayor que para el viroide cachexia, ni incrementando incluso el número de ciclos a 37 y 40. En este sentido Hataya y cols. (1992) han señalado que el grosor e intensidad de la banda amplificada por PCR puede deberse a una insuficiente clarificación de la muestra lo cual obstruye la reacción. El RNA de cidra sin inocular nunca mostró indicios de amplificación bajo las condiciones probadas.

4.4 Hibridación molecular

De acuerdo con el ensayo de hibridación practicado para la comparación de 5 métodos de extracción del RNA, la Figura 9 muestra los resultados emitidos después del análisis de la membrana.

Hubo reacción en las posiciones correspondientes al RNA extraído por 4 métodos (en las 2 repeticiones) debido a que hibridaron con la sonda, sin embargo la reacción fue un poco débil en todos los casos debido a que la sonda es específica

para el viroide PSTVd, y las muestras colocadas en la membrana contenían el viroide CEVd, sin embargo ambos viroides comparten una elevada homología (Bussiére y cols., 1996) lo cual produjo la reacción de hibridación. No hubo mucha diferencia en la intensidad de las manchas entre los métodos que reaccionaron lo cual indica que fueron igualmente efectivos para la extracción del RNA viroidal y por lo tanto para la detección de viroides ya que en todos ellos se cargó con la misma cantidad de RNA total (800 ng). El RNA extraído por el método de Pallás y cols. (1987) fue el único que no dió reacción lo cual pudo deberse a que en este caso se cargó con menor cantidad de RNA (300 ng) que en los otros 4 métodos provocando un resultado falso negativo. De acuerdo con la compañía que elaboró la sonda, la sensibilidad del método es de 4-6 pg de RNA viroide (Agdia, Inc.).

En el caso de las especies vegetales hospedadoras pepino y tomate, se realizaron 2 tipos de inoculaciones: 1) con el viroide exocortical y otra con el total extraído tanto de pepino como de tomate. Hubo transmisión de los viroides a las plantas hospedadoras lo cual fue comprobado por RT-PCR. La electroforesis secuencial sólo fue detectada en el viroide exocortical.



Método	Posición	Resultado	
		Repetición I	Repetición II
Pfannenstiel y cols. (1980)	A5, A11	PvS	P?S
Chomczynski y Sacchi (1987)	A4, A10	PvS	PvS
Pallás y cols. (1987)	A6, A12	NEG	NEG
Yang y cols. (1992)	A3, A9	P?S	P?S
Lee (1995)	B1, B7	P?S	PvS

Claves de interpretación:

POS, mancha muy intensa, resultado positivo definitivo

PwS, mancha fácilmente visible, resultado positivo

PvS, mancha débil, resultado positivo probable

P?S, mancha apenas detectable, resultado posible positivo o negativo

NEG, negativo

Fig. 9. Reacción de hibridación para el viroide tubérculo fusiforme de la papa con RNA extraído de cidra Etrog por 5 métodos.

Es importante señalar que la aplicación de las muestras de cidra a una membrana específica para otro viroide diferente de exocortis y cachexia se consideró por dos motivos, primero porque en México y E.U. no hay pruebas comerciales de hibridación para estos viroides, y segundo que el viroide causante del tubérculo fusiforme de la papa es muy parecido a exocortis con el cual comparte más del 90% de homología, y de hecho se les clasifica a ambos en el mismo grupo (Bussiére y cols., 1996).

4.5 Transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad

En el caso de las especies vegetales herbáceas pepino y tomate, se realizaron 2 tipos de inoculaciones: una con RNA total extraído de limón Persa, y otra con el viroide exocortis eluido a partir del gel desnaturalizante, el cual fue cargado con RNA total extraído también de limón Persa. En el caso de las inoculaciones con RNA total hubo transmisión de los viroides exocortis y cachexia a las 2 especies citadas lo cual fue comprobado por RT-PCR, pero al realizar la electroforesis secuencial sólo fue detectado el viroide exocortis. La técnica de sPAGE fue limitante en la detección del viroide cachexia, aún y cuando se utilizó RNA de pepino que se sabe que es una especie capaz de multiplicar a este viroide en mayores concentraciones que el hospedante natural (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Semancik y cols., 1988a, 1988b; Semancik y Duran-Vila, 1991; Staub y cols., 1995). Por otra parte, la inoculación con el viroide exocortis recuperado del gel desnaturalizante también fue transmitido a las 2 especies referidas.

Con respecto a la reacción de las plantas al introducir RNA total, el pepino presentó un acortamiento de entrenudos, mosaico clorótico con un gradiente de intensidad del color verde del interior hacia el borde de la hoja (de mayor a menor intensidad), y arrugamiento y reducción en el tamaño de las hojas de nuevo crecimiento (Fig. 21E); sin embargo este último síndrome no fue exclusivo de las plantas inoculadas, por lo que esta reacción debe tomarse con la reserva que el caso amerita. De acuerdo con Semancik y cols. (1988a) los síndromes anteriores además de una proliferación de yemas florales, son ocasionados por el viroide cachexia ya que el pepino es un acarreador asintomático de exocortis. Lo anterior se ha reportado utilizando el cultivar Suyo el cual no fue posible conseguir para este trabajo por lo que se realizó con pepino cv Poinsett. Ninguna de las plantas de tomate inoculadas mostró síntomas por la presencia de los viroides introducidos a pesar de utilizar la