

variedad recomendada, Rutgers (Baksh y cols., 1984) y se desconoce el motivo de este comportamiento, pero es posiblemente debido a una alteración en el metabolismo normal de las plantas ocasionado por las elevadas temperaturas que prevalecieron temporalmente en el invernadero, las cuales alcanzaron hasta los 55°C.

Todas las especies leñosas inoculadas con yemas de limón Persa de las 4 localidades de estudio fueron receptoras de los viroides exocortis y cachexia, sin embargo al igual que en las especies herbáceas, tampoco fue posible detectar en estas muestras al viroide cachexia por sPAGE y sólo por RT-PCR. Con respecto a lo anterior, Duran-Vila y cols. (1991) propusieron una combinación de inoculaciones en cidra y sPAGE para la detección indirecta de CCaVd. Este procedimiento aunque fue exitoso, es dependiente de la temperatura de incubación requiriéndose de 3 a 7 meses para su detección con temperaturas de 18-32°C.

Si bien es cierto que en el caso que nos ocupa se muestrearon las especies leñosas inoculadas con yemas contaminadas por viroides, incluyendo cidra, a los 8 meses después de la inoculación, también es cierto que las plantas se mantuvieron en un invernadero sin control térmico y con una elevada fluctuación de temperatura diaria (15-40°C) y estacional. Además los resultados de Duran-Vila y cols. (1991) son válidos sólo para la transmisión individual de CCaVd a cidra, y en el presente trabajo se hizo una transmisión conjunta de al menos CCaVd y CEVd de tal forma que pudo haber mayor acumulación de CEVd tal como lo imaginó Semancik y cols. (1988a) quienes mencionaron que CCaVd se acumulaba de 5 a 10 veces menos en cidra cuando coexiste con CEVd y CVd-I. Unos años después, Semancik y cols. (1991, 1992) demostraron interferencia y antagonismo entre viroides de cítricos, lo cual significa que un viroide interfiere en la replicación y acumulación de otro. El Cuadro 11 resume las reacciones y detecciones realizadas en las diferentes especies.

Cuadro 11. Transmisión de viroides a diferentes especies vegetales a partir de RNA total, RNA viroidal y yemas de limón Persa.

Especie	Síntomas	RT-PCR		sPAGE	
		CEVd	CCaVd	CEVd	CCaVd
tomate	sin síntomas	+	+	+	-
pepino	acortamiento de entrenudos, mosaico clorótico	+	+	+	-
naranja agrio	sin síntomas	+	+	+	-
n. dulce Pineapple	sin síntomas	+	+	+	-
mand. Cleopatra	sin síntomas	+	+	+	-
citrange Troyer	sin síntomas	+	+	+	-
cidra Etrog	epinastia	+	+	+	-

#### 4.6 Validación integrada de técnicas moleculares en diversos hospedantes

**4.6.1 Naranja dulce de Nuevo León.** Después de realizar la colecta y extracción de ácidos nucleicos por el método de Lee (1995) a partir de 4 g de corteza desprendida de varetas de nuevo crecimiento en 7 árboles del lote de variedades de naranja dulce de ciclo temprano, se separó el RNA en un gel de agarosa al 0.8% para observar la calidad del RNA ribosomal como un indicador del proceso de extracción, el cual puede apreciarse en la Figura 10. También se hicieron cuantificaciones del RNA total por espectrofotometría encontrándose valores que oscilaron entre 115 y 142  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

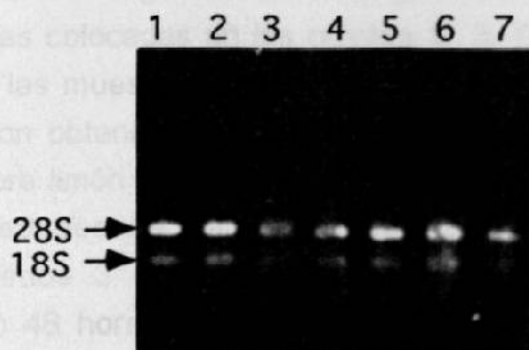


Fig. 10. Separación en un gel de agarosa al 0.8% del RNA obtenido de muestras de naranja dulce de un lote de variedades tempranas del CEGET, N.L. Se cargó con 1  $\mu\text{g}$  de RNA por carril. Los números de los carriles indican variedades de naranja.

Una vez comprobado el éxito de la extracción del RNA total, se procedió a separarlo en dos geles de poliacrilamida, uno bajo condiciones nativas (Fig. 11), y un segundo gel desnaturizante con urea (Fig. 12). En el gel nativo no fue posible asociar una banda con el viroide exocortis posiblemente debido a la baja concentración del mismo ya que se cargó con tan solo 2  $\mu\text{g}$  de RNA total, también la abundancia de otros RNAs hospederos pudieron obstruir la visualización de los viroides (Semancik y cols., 1988b). Al intentar cargar el gel con cantidades mayores de 2  $\mu\text{g}$  de RNA que aseguraran una cantidad suficiente de viroides capaz de ser visualizados en el gel de poliacrilamida, se obtuvo un perfil de bandeo más oscuro dando la apariencia de barrido y haciendo indistinguibles las bandas.

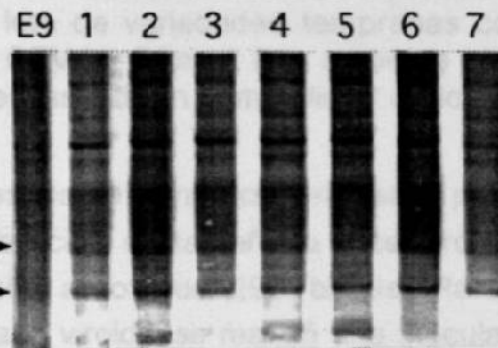


Fig. 11. Separación del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce en un gel de poliacrilamida nativo al 5%. E9 testigo con exocortis. Los números corresponden a variedades de naranjo. Las flechas delimitan la región de movilidad probable de los viroides. Se cargó con 2  $\mu\text{g}$  de RNA total por carril.

Al comparar los perfiles de RNA obtenidos en las muestras de campo con los del carril correspondiente al testigo viroidal en el gel desnaturizante (Fig. 12), se observó que las muestras colocadas en los carriles 1, 3, 6 y 7 contienen el viroide exocortis, en tanto que las muestras de los carriles 2, 4 y 5 no se observó. Estos mismos resultados fueron obtenidos en un bioensayo realizado en invernadero en cidra Etrog injertada sobre limón rugoso, en donde la cidra fue inoculada con yemas de las diferentes variedades de naranjo dulce (Sánchez-Salas, 1980), dicho bioensayo tardó al menos 3 meses en mostrar reacción comparado con la electroforesis que tardó 48 horas a partir del momento en que se recibieron las muestras hasta el revelado del gel. De aquí se desprende el ahorro en tiempo con la técnica establecida, entre otras ventajas.

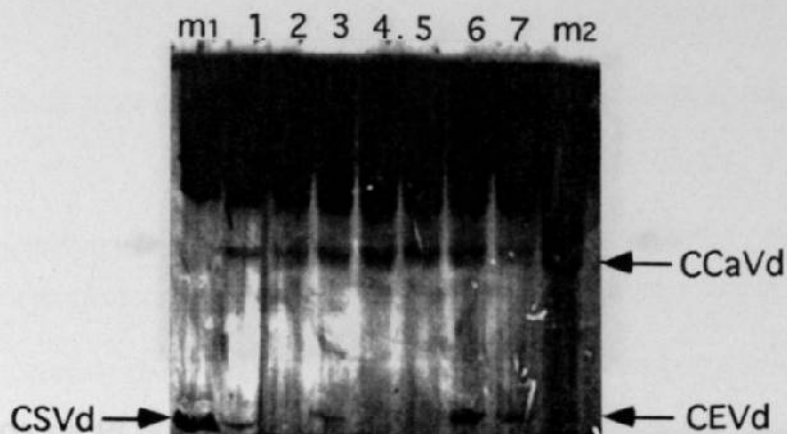


Fig. 12. Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de árboles de naranjo dulce del lote de variedades tempranas colectadas en el CEGET, N.L. m<sub>1</sub> CSVd, m<sub>2</sub> CEVd y CCaVd. Los números corresponden a variedades de naranjo y las flechas indican la movilidad de los viroides señalados.

Al comparar las muestras de campo con el testigo para cachexia (carril m<sub>2</sub>), se observó una línea muy parecida en tamaño a este viroide en las 7 muestras de campo, pero con una talla aprox. de 295 bases. Para precisar si esta línea corresponde a RNA vegetal o viroidal se realizó una inoculación en pepino. También se le practicó RT-PCR al RNA de las 7 muestras de naranjo utilizando los iniciadores específicos para cachexia. Las plantas de pepino inoculadas no mostraron reacción alguna a la introducción del RNA, y las reacciones de RT-PCR no produjeron ninguna amplificación por lo que se concluyó que la banda estudiada no corresponde al viroide cachexia. Por la talla molecular estimada existe la posibilidad de que dicha banda corresponda al viroide III de los cítricos el cual contiene 294 y 297 bases (Rakowski y cols., 1994; Stasys y cols., 1995); sin embargo esto parece poco probable considerando que dicha banda se observó en las 7 muestras y además no se presentó en las muestras de los árboles de las repeticiones II, III y IV del mismo lote.

Todas las muestras anteriores también fueron sometidas a amplificación por RT-PCR con los iniciadores específicos para exocortis con los resultados observados en la Figura 13. Al igual que en sPAGE y en el bioensayo en cidra Etrog, las muestras 1, 3, 6 y 7 resultaron positivas para el viroide exocortis, y las muestras 2, 4 y 5 negativas.

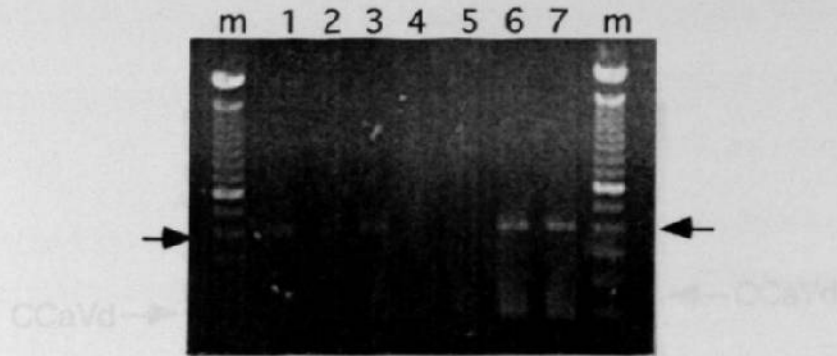


Fig. 13. Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para exocortis en 7 muestras de naranjo dulce. m es un marcador de peso molecular. Los números de los carriles corresponden a variedades de naranjo, y las flechas señalan el fragmento amplificado de 370 pb aprox.

Fig. 14. Electroforesis secuencial del PCR oxidado a partir de muestras de limón Persa seleccionadas en Tabasco, en muestra control, en carriles de yemas.

Es importante señalar que además de las muestras aquí reportadas, se analizaron las repeticiones II, III y IV del mismo lote con resultados similares, es decir las variedades en donde se detectó exocortis también resultaron positivas en las otras repeticiones, lo cual parece lógico considerando un origen común de las yemas injertadas en cada una de las repeticiones. Aún y cuando todas las variedades se encontraban coexistiendo en el mismo lote, no parece haber ocurrido transmisión mecánica a árboles sanos con el transcurso del tiempo a pesar de que se sabe que algunos utensilios agrícolas como navaja, arado, machete y tijeras podadoras son medios de transmisión de viroides (Garnsey y Jones, 1967). Ninguno de los árboles del lote referido mostró síntomas de infección por viroides lo cual realza la importancia de la detección realizada.

**4.6.2 Limón Persa de Tabasco.** La electroforesis secuencial realizada con RNAs extraídos de 8 árboles seleccionados con base en 3 niveles de deterioro (3 árboles vigorosos, 3 con deterioro moderado y 2 con deterioro acentuado) se aprecia en la Figura 14, en la cual se observa que todas las muestras de campo fueron positivas al viroide exocortis en función de la movilidad observada del RNA, comparado con los carriles testigo (viroide semipurificado en Florida, E.U.). Las muestras 7 y 8 mostraron una intensidad mayor de la banda del viroide que el resto, lo cual fue coincidente con la severidad del síntoma observado en campo.

Figura 16 encontrándose que todas las muestras evaluadas resultaron positivas con una amplificación única y específica, con la talla molecular esperada de 297-300 pb. Se realizó un análisis de restricción del producto amplificado para asegurar aún más que se trataba del viroide *Orchlexia* digiriendo el producto con la enzima *HpaI* y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 97 y otro de 200 pb aprox. tal y como se esperaba

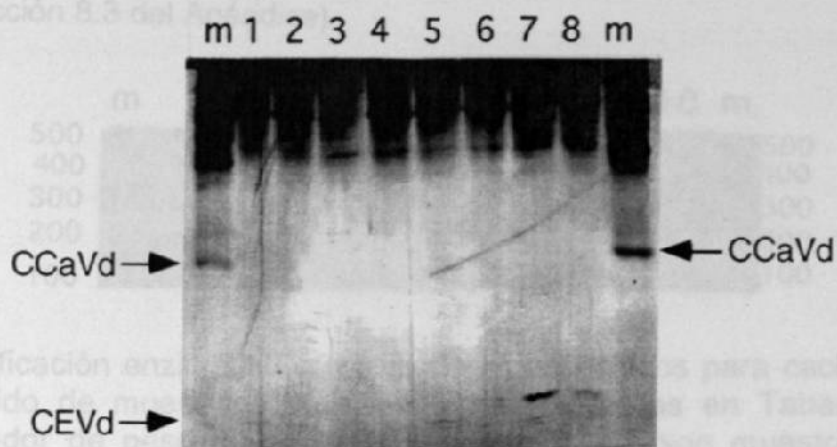


Fig. 14. Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco. m muestra control que contiene los viroides exocortis y cachexia. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7 y 8 con deterioro acentuado.

Al realizar una RT-PCR con iniciadores específicos para exocortis, también se observó que todas las muestras dieron una reacción positiva obteniéndose un producto de aprox. 370 pb (Fig. 15).

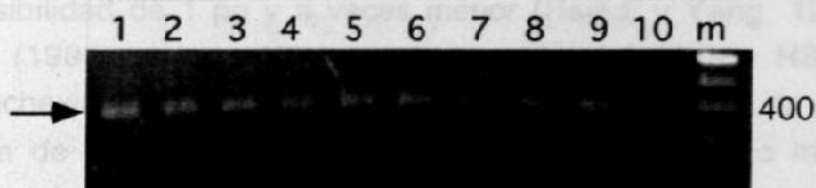


Fig. 15. Amplificación enzimática con iniciadores específicos para exocortis del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco. m es un marcador de peso molecular. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7, 8 y 9 con deterioro acentuado; 10 testigo negativo (sin cDNA). La flecha corresponde a una talla de 370 pb aprox.

Aún y cuando en la sPAGE no se observó al viroide cachexia, las reacciones de RT-PCR específicas para este viroide externaron los resultados observados en la Figura 16 encontrándose que todas las muestras evaluadas resultaron positivas con una amplificación única y específica, con la talla molecular esperada de 297-300 pb. Se realizó un análisis de restricción del producto amplificado para asegurar aún más que se trataba del viroide cachexia digiriendo el producto con la enzima *Hinf-I* y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 97 y otro de 200 pb aprox. tal y como se esperaba

según una simulación computacional realizada con el programa DNA Strider (Mark, 1988) (ver sección 8.3 del Apéndice).

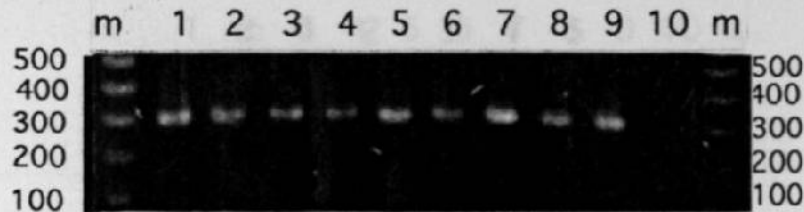


Fig. 16. Amplificación enzimática con iniciadores específicos para cachexia del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco. m es un marcador de peso molecular. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7, 8 y 9 con deterioro acentuado; 10 testigo negativo (sin cDNA).

Fig. 17. Electroforesis secuencial del RNA virado de 5 muestras de limón Persa de Tabasco. m es un marcador de peso molecular. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7, 8 y 9 con deterioro acentuado; 10 testigo negativo (sin cDNA).

La imprecisión en la detección de cachexia por sPAGE parecería provocar un demérito en la técnica, sin embargo está bien documentado en la literatura que este viroide se presenta en forma natural en muy baja concentración, normalmente imperceptible para la electroforesis directa de árboles de campo (Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Semancik y cols., 1988a) la cual tiene una sensibilidad de 10 ng (Sambrook y cols., 1989; Semancik y Durán-Vila, 1991) comparada con el PCR que tiene una sensibilidad de 1 pg y a veces menor (Hadidi y Yang, 1991). De hecho Staub y cols. (1995) estimaron la concentración del viroide HSVd el cual es homólogo a cachexia, en 2 ng/40  $\mu$ g de RNA/g de hoja de vid, y de 40 ng/40  $\mu$ g de RNA/g de hoja de pepino. Por lo anterior, para un diagnóstico más preciso, se requieren de las dos técnicas validadas en el presente trabajo, por lo que pueden considerarse mutuamente complementarias.

**4.6.3 Limón Persa de Yucatán.** Los resultados obtenidos con el análisis de 13 muestras colectadas en el estado de Yucatán se presentan de acuerdo con la fecha de colecta, es decir un primer grupo de 5 muestras colectadas repetidamente en febrero y septiembre de 1997, y luego otro grupo de 8 muestras colectadas en noviembre del mismo año.

Con respecto al primer grupo de muestras, la electroforesis secuencial fue capaz de detectar exocortis en 3 de las 5 muestras analizadas, las cuales corresponden a las de apariencia sana en campo, y no se detectó al viroide cachexia en ninguna de ellas (Fig. 17); en cambio por RT-PCR se encontró que las mismas 3 muestras no tenían exocortis, pero sí cachexia. Igual que en otros casos se detectó cachexia sólo por RT-PCR en 5 de las 8

muestras positivas por electroforesis contienen CEVd y CCaVd, y que las otras 2 están libres de estos viroides (Fig. 18).

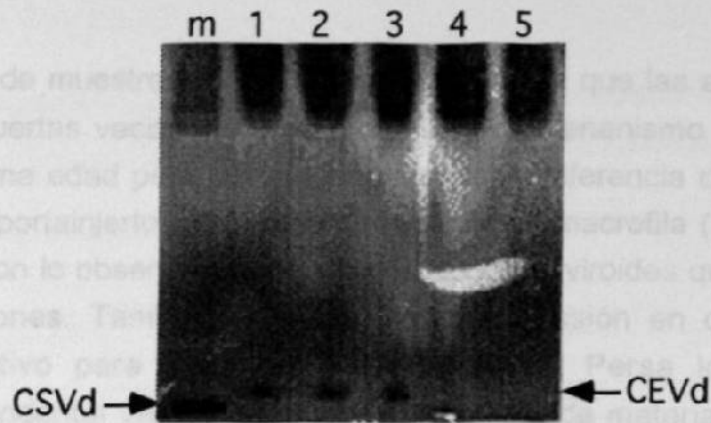


Fig. 17. Electroforesis secuencial del RNA extraído de 5 muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán. m es CSVd.

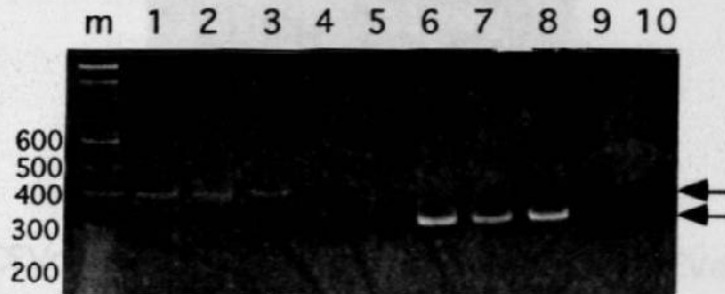


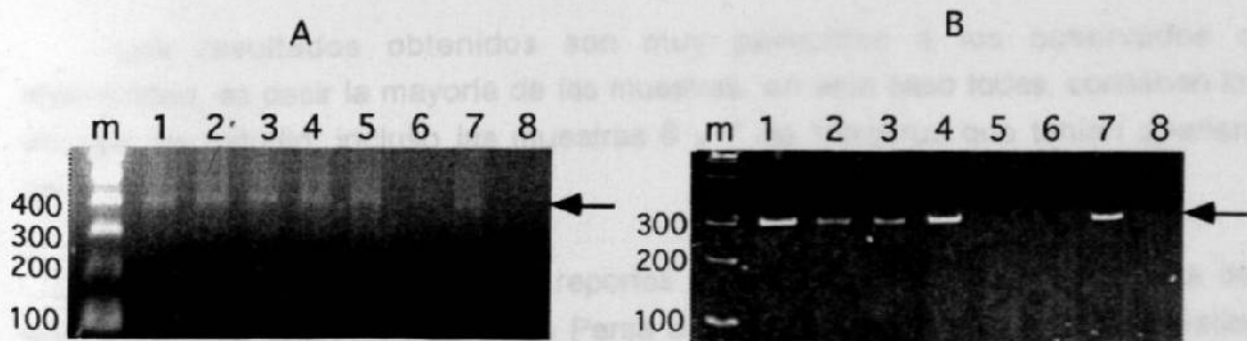
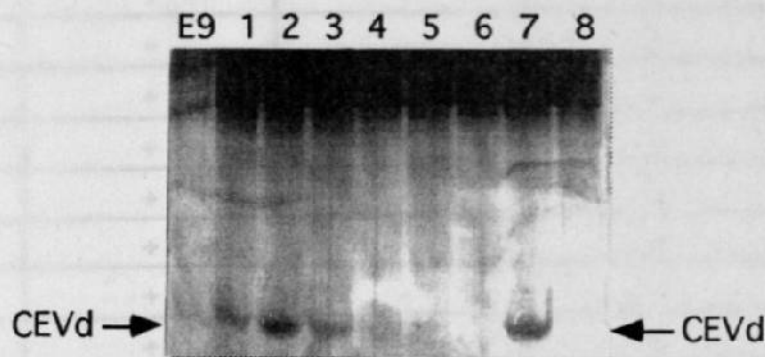
Fig. 18. Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis (carriles 1, 2, 3, 4 y 5) y cachexia (6, 7, 8, 9 y 10) en muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán. m es un marcador de peso molecular. Las flechas señalan los fragmentos amplificados de 370 y 300 pb respectivamente.

En el segundo grupo de muestras colectadas en varios huertos físicamente separados pero adyacentes uno del otro, se encontraron resultados consistentes para el viroide exocortis con los dos métodos evaluados (sPAGE y RT-PCR), encontrándose 5 muestras positivas y 3 negativas, sin embargo en la muestra 4 de apariencia sana, sólo fue detectado el viroide exocortis por RT-PCR pero no por electroforesis (Figs. 19 y 20A). Lo anterior podría ser explicable en el sentido de que la apariencia sana pueda denotar baja concentración del patógeno misma que no pudo ser detectada por sPAGE debido a la sensibilidad del método. Es probable también que la muestra referida proceda de un árbol de reciente infección por medios mecánicos debido a la cercanía con plantaciones que presentan síntomas severos. Igual que en otros casos se detectó cachexia sólo por RT-PCR en 5 de las 8



muestras (Fig. 20B). También parece probable un origen distinto entre las yemas usadas para injertar los árboles de la huerta sana (Fig. 21A) y los árboles de la huerta enferma (Fig. 21B).

Esta forma de muestreo aportó mayor información que las anteriores debido a la selección de huertas vecinas con daños severos de enanismo y agrietamiento, y huertas de la misma edad pero de apariencia sana. A diferencia de otros muestreos en este huerto el portainjerto predominante es el limón macrofila (*C. macrophylla*) el cual de acuerdo con lo observado, es más susceptible a viroides que el naranjo agrio de otras plantaciones. También esta fue la única ocasión en que se obtuvo un diagnóstico negativo para ambos viroides en limón Persa lo cual tiene una importancia trascendental ya que asegura la existencia de material sano en el país, el cual pudiera ser utilizado para la donación de yemas de futuras plantaciones.



**4.6.4 Limón Persa de Tamaulipas y Veracruz.** Se analizaron 7 muestras de limón Persa colectadas en Tamaulipas y 7 en Veracruz cuyos resultados de detección de viroides obtenidos con los métodos sPAGE y RT-PCR se presentan en forma concentrada en el Cuadro 12.

**Cuadro 12.** Detección de viroides por sPAGE y RT-PCR a partir de RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas y Veracruz.

Muestra	sPAGE		RT-PCR	
	exocortis	cachexia	exocortis	cachexia
Tamaulipas-1	+	-	+	+
Tamaulipas-2	+	-	+	+
Tamaulipas-3	+	-	+	+
Tamaulipas-4	+	-	+	+
Tamaulipas-5	+	-	+	+
Tamaulipas-6	+	-	+	+
Tamaulipas-7	+	-	+	+
Veracruz-1	+	-	+	+
Veracruz-2	+	-	+	+
Veracruz-3	+	-	+	+
Veracruz-4	+	-	+	+
Veracruz-5	+	-	+	+
Veracruz-6	+	-	+	+
Veracruz-7	+	-	+	+

Los resultados obtenidos son muy parecidos a los observados con anterioridad, es decir la mayoría de las muestras, en este caso todas, contienen los 2 viroides de estudio, incluso las muestras 6 y 7 de Veracruz que tenían apariencia sana al momento de colectarse.

A pesar de la existencia de reportes muy antiguos sobre la ocurrencia de la enfermedad de la corteza en limón Persa o Tahiti, fue hasta 1965 cuando Salibe y Moreira mediante bioensayos en plantas indicadoras determinaron que dicha enfermedad caracterizada por un agrietamiento longitudinal y hundimiento en algunas áreas de la corteza del tallo principal y ramas, se debía a exocortis. Recientemente, Ochoa y cols. (1996) utilizando los métodos moleculares sPAGE y

RT-PCR encontraron CEVd y otros viroides de cítricos asociados con árboles de limón Persa en Venezuela que mostraban los mismos síntomas descritos por Salibe y Moreira (1965).

En México el limón Persa ocupa el tercer lugar en importancia de las especies cítricas con una superficie cultivada de 18,500 ha aproximadamente distribuidas en 7 estados de la República Mexicana, donde Veracruz, Tabasco, Yucatán y Oaxaca contribuyen con el 98% de la producción, y en 1993 México era el principal país productor de fruto en el mundo (Gómez-Cruz y cols., 1994). Previo a este trabajo, no existían reportes sobre la ocurrencia y daños de las enfermedades viroidales en las plantaciones de limón Persa en México. Los resultados observados en las muestras colectadas en huertos comerciales de los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán fueron muy consistentes y en cierta medida alarmantes debido a la elevada incidencia de los viroides exocortis y cachexia asociados a una sintomatología de agrietamiento en el tallo principal y ramas, reducción de copa y pérdida de vigor, tanto en las plantaciones adultas como en plantaciones recientes. Por lo anterior se considera importante promover medidas inmediatas como la realización de un estudio epidemiológico así como el resguardo y certificación de plantas sanas que pudieran ser usadas para la donación de yemas en futuras plantaciones. Simultáneamente se recomienda también la implementación de un programa de saneamiento el cual podría incluir cultivo de meristemos *in vitro* o microinjerto, con la finalidad de sanear y conservar la variabilidad genética disponible de limón Persa.

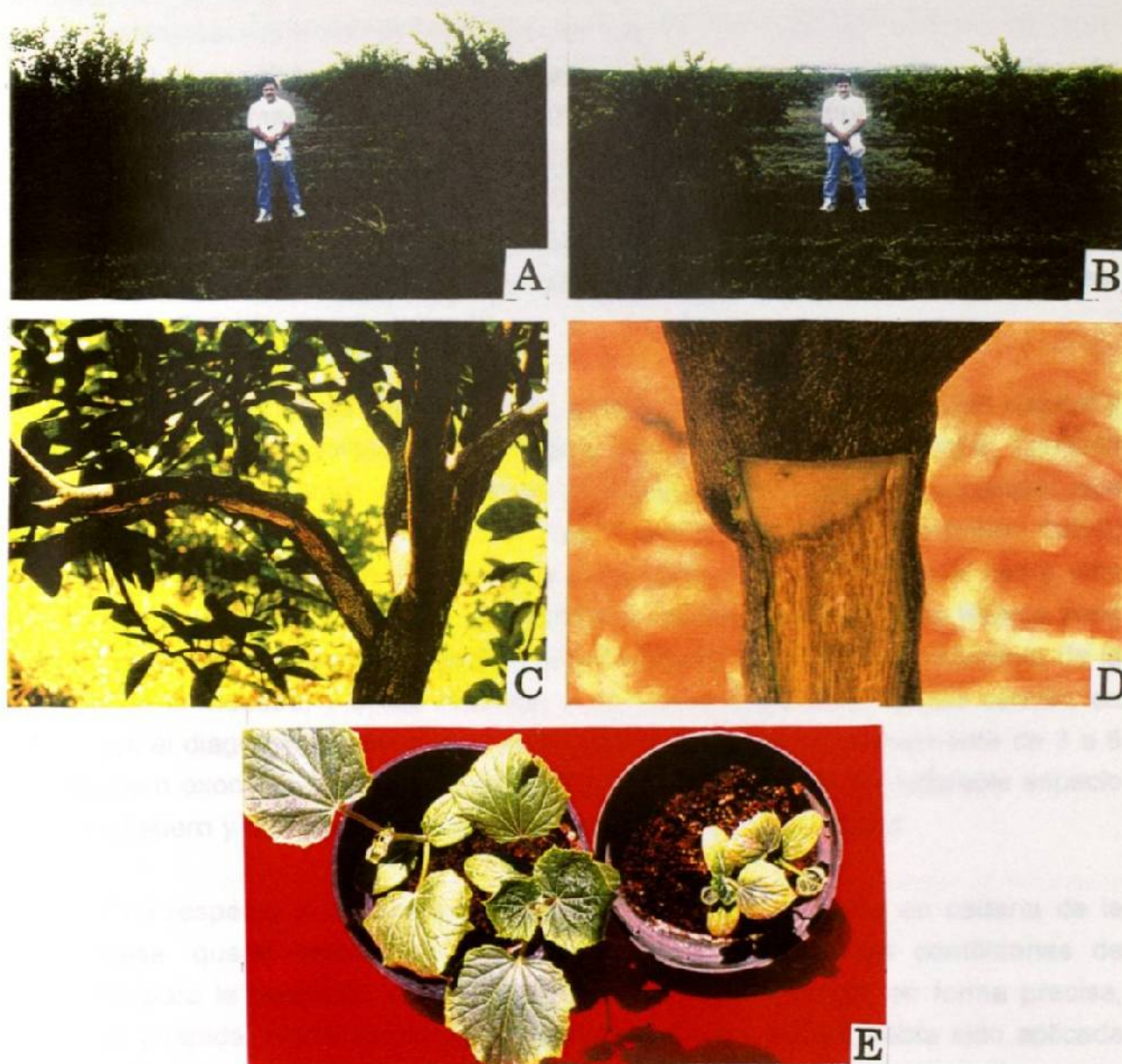


Fig. 21. Síntomas asociados con la ocurrencia de viroides en limón Persa y pepino. **A.** Árboles de 2 años de edad injertados con yemas de limón Persa sano sobre limón macrofila (*C. macrophylla*). **B.** Árboles infectados con una mezcla de los viroides exocortis y cachexia en una plantación comercial. Note el contraste en tamaño y vigor de los árboles. Ambos huertos tienen la misma edad y están ubicados en posiciones adyacentes. **C.** Agrietamiento de la corteza en el tallo principal y ramas de limón Persa. **D.** Lesiones en la madera en la porción del portainjerto limón macrofila, asociadas con el viroide cachexia. **E.** Reacción de plantas de pepino a la inoculación con RNA conteniendo los viroides exocortis y cachexia comparado con un testigo sin inocular.

## V. CONTRIBUCIONES Y RELEVANCIA

Como se ha mencionado con anterioridad, previo a este trabajo de investigación existía poca información sobre la ocurrencia de viroides patógenos de cítricos en México con tan solo tres trabajos relacionados con el tema (Moreno-Mata, 1995; Robles-Serna, 1985; Sánchez-Salas, 1980); dos de ellos publicados a principios de los 80's. También el método de diagnóstico rutinario disponible para las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos basado en plantas diferenciales, estaba muy limitado.

Con este trabajo se puede asegurar el éxito en la extracción de RNA vegetal y viroidal, siguiendo el protocolo de cualquiera de los 5 métodos evaluados. También se logró la implementación y optimización de la técnica electroforesis secuencial, que aunque fue originalmente establecida hace 14 años (Semancik y Harper, 1984), requiere de condiciones particulares para cada caso, y se desconoce si había sido usada con anterioridad en México para detección de fitopatógenos. Esta técnica tiene la ventaja de ser rápida ya que tarda alrededor de 2-3 días desde el momento de la colecta de la muestra, y utiliza reactivos y equipo de laboratorio de uso común, en tanto que el diagnóstico basado en plantas diferenciales tarda normalmente de 3 a 6 meses para exocortis, y 12 meses para cachexia y requiere de considerable espacio de invernadero y condiciones controladas de temperatura del mismo.

Con respecto a la técnica transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa, quedó establecido un protocolo completo con las condiciones de reacción para la detección de los viroides exocortis y cachexia, en forma precisa, sensible y rápida. Hasta donde sabemos, tampoco esta técnica había sido aplicada en México para diagnóstico de enfermedades viroidales en especies vegetales.

Las dos técnicas moleculares anteriores fueron exhaustivamente probadas con muestras de naranjo dulce y limón Persa, sobretudo este último, con lo cual se pudo conocer la situación sanitaria que mantienen algunas plantaciones comerciales muestreadas en 4 estados de la República Mexicana.

Desde el planteamiento del trabajo se remarcó el carácter práctico y el potencial de aplicación de las técnicas a implementar. Los resultados obtenidos pueden contribuir significativamente a la regulación y prevención de la diseminación de enfermedades ocasionadas por viroides en la citricultura nacional, sobre todo

mediante la certificación de lotes donadores de yemas así como de material de introducción al país. Las técnicas establecidas también pueden facilitar estudios epidemiológicos para determinar la diseminación de viroides en plantaciones comerciales. Finalmente se agregaría que este trabajo no solo hizo aportaciones al conocimiento, si no que también generó nuevas inquietudes por lo que se anticipa la continuidad del mismo.

## **VI. CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos y con las condiciones que prevalecieron durante el desarrollo de esta investigación se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Es factible la detección rápida y precisa de los viroides exocortis y cachexia en muestras de cítricos, utilizando en forma complementaria las técnicas de electroforesis secuencial (sPAGE) y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

2. Se logró la implementación de la técnica electroforesis secuencial con viroides testigos, permitiendo además la detección del viroide exocortis en RNA extraído de muestras de árboles de campo de naranjo dulce y limón Persa, sin embargo, la técnica no fue lo suficientemente sensible para detectar al viroide cachexia.

3. Los 5 métodos de extracción de RNA evaluados fueron efectivos en la obtención de RNA en buena cantidad y calidad, necesario para la detección de viroides por sPAGE y RT-PCR.

4. Es posible amplificar por RT-PCR al DNA complementario del RNA de los viroides exocortis y cachexia aislado de pepino, tomate, cidra Etrog, mandarinos Parson's Special y Cleopatra, naranjo agrio, naranjo dulce y citrange Troyer.

5. Las técnicas establecidas de sPAGE y RT-PCR son reproducibles y pueden ser aplicadas en la detección de los viroides exocortis y cachexia de los cítricos a partir de árboles de campo de naranjo dulce y limón Persa.

6. El agrietamiento de la corteza del tallo principal y ramas laterales así como el enanismo de limón Persa se deben al menos a la ocurrencia de los viroides exocortis y cachexia.

7. Los viroides exocortis y cachexia de los cítricos pueden ser transmitidos y replicados por las plantas herbáceas pepino y tomate, así como por las plantas leñosas cidra Etrog, mandarino Cleopatra, naranjo agrio, naranjo dulce Pineapple y citrange Troyer.

## VII. LITERATURA CITADA

- Albanese, G., Renis, M., Grimaldi, V., La Rosa, R., Polizzi, G., and Diener, T.O. 1991. Hybridization analysis of citrus viroids with citrus exocortis viroid- and hop stunt viroid-specific probes. *In*: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 202-205. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R., and Bar-Joseph, M. 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* 19:4767.
- Atkins, D., Young, M., Uzzell, S., Kelly, L., Fillatti, J., and Gerlach, W.L. 1995. The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J. Gen. Virol.* 76:1781-1790.
- Baksh, N., Lee, R.F., and Garnsey, S.M. 1984. Detection of citrus exocortis viroid by polyacrylamide gel electrophoresis. *In*: Proc. of the 9<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 343-352. S.M. Garnsey, L.W. Timmer, and J.A. Doods (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Becker, I., Kreuzaler, F., and Fladung, M. 1994. Inhibition of viroids infection by antisense RNA expression in transgenic plants. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 375:765-777.
- Boccardo, G., La Rosa, R., and Catara, A. 1984. Detection of citrus exocortis viroid by polyacrylamide gel electrophoresis of nucleic acid extracts from glasshouse citrus. *In*: Proc. of the 9<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 357-361. S.M. Garnsey, L.W. Timmer, and J.A. Doods (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Bussièrre, F., Lafontaine, D., and Perreault, J.-P. 1996. Compilation and analysis of viroid and viroid-like RNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 24:1793-1798.
- Calavan, E.C., Frolich, E.C., Carpenter, J.B., Roistacher, C.N., and Christiansen, D.W. 1964. Rapid indexing for exocortis of citrus. *Phytopathology* 54:1359-1362.
- Childs, J.F.L. 1950. The cachexia disease of Orlando tangelo. *Plant Dis. Repr.* 34:295-298.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analy. Biochem.* 162:156-159.
- Davino, M., Pelicani, L., Renis, M., and Albanese, G. 1991. Homology of hop stunt viroid with citrus cachexia viroid. *In*: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 196-201. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.



- Diener, T.O. 1971. Potato spindle tuber "virus", IV. A replicating low molecular weight RNA. *Virology* 45:411-428.
- Diener, T.O. 1979. *Viroids and viroid diseases*. John Wiley and Sons. New York. 251p.
- Diener, T.O. and Lawson, R.H. 1973. Chrysanthemum stunt: A viroid disease. *Virology* 51:94-101.
- Diener, T. O., Smith, D.R., Hammond, R.H., Albanese, G., La Rosa, R., and Davino, M. 1988. Citrus B viroid identified as a strain of hop stunt viroid. *Plant Dis.* 72:691-693.
- Di Sergio, F., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A., and Flores, R. 1996. Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. *J. Gen. Virol.* 77:2833-2837.
- Duran-Vila, N., Pina, J. A., Ballester, J. F., Juarez, J., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R., and Semancik, J. S. 1988a. The citrus exocortis disease: A complex of viroid-RNAs. *In: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol.* pp 152-164. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Molins, M.I., and Navarro, L. 1991. A new indexing method for cachexia. *In: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 224-229. R.H. Bransky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., and Navarro, L. 1993. Improved indexing of citrus viroids. *In: Proc. of the 12<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 202-211. P. Moreno, J.V. da Graça, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R., and Semancik, J.S. 1988b. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *J. Gen. Virol.* 69:3069-3080.
- Engels, B. 1993. *Amplify. Version 1.2. For analyzing PCR experiments.* University of Wisconsin. Madison, WI.
- F.A.O.-I.B.P.G.R. 1991. *Food and Agriculture Organization/International Board for Plant Genetic Resources. Technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm.* E.A. Frison and M.M. Taher (eds.).
- Flores, R. 1988. Detection of citrus exocortis viroid in natural and experimental citrus hosts by biochemical methods. *In: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol.* pp 192-196. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Flores, R. and Llácer, G. 1988. Isolation of a viroid-like RNA associated with peach latent mosaic disease. *Acta Horticulturae* 235:325-332.

- Galindo, A., Smith, D.R., and Diener, T.O. 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology* 72:49-54.
- Garnsey, S.M. and Jones, J.W. 1967. Mechanical transmission of exocortis virus with contaminated budding tools. *Plant Dis. Repr.* 51:410-413.
- Gillings, M. R., Broadbent, P., and Gollnow, B. I. 1988. Biochemical indexing for citrus exocortis viroid. *In: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol.* pp 178-187. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Gómez Cruz, M.A., Schwentesius, R.R. y Barrera González, A. 1994. El limón persa en México. Una opción para el trópico. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Universidad Autónoma Chapingo y Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial. Ediciones Mario García Sordo.
- Gross, H.J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Albery, H., Ramm, K., and Sanger, H.L. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroids. *Eur. J. Biochem.* 121:249-257.
- Hadas, R. and Bar-Joseph, M. 1991. Variation in tree size and rootstock scaling of grapefruit trees inoculated with a complex of citrus viroids. *In: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 240-243. R.H. Bransky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Hadidi, A., Huang, C., Hammond, R. W., and Hashimoto, J. 1990. Homology of the agent associated with dapple apple disease to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids. *Phytopathology* 80:263-268.
- Hadidi, A. and Yang, X. 1990. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *J. Virol. Meth.* 30:261-270.
- Hashimoto, J. and Koganezawa, H. 1987. Nucleotide sequence and secondary structure of apple scar skin viroid. *Nucleic Acids Res.* 15:7045-7052.
- Hataya, T., Hikage, K., Suda, N., Nagata, T., Li, S., Itoga, Y., Tanikoshi, T., and Shikata, E. 1992. Detection of hop latent viroid (HLVd) using reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). *Ann. Phytopath. Soc. of Japan* 58:677-684.
- Henson, J. M. and French, R. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:81-109.
- Hernández, C., Elena, S.F., Moya, A., and Flores, R. 1992. Pear blister canker viroid is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and also has sequence homology with viroids from other subgroups. *J. Gen. Virol.* 73:2503-2507.

- Hernández, C. and Flores, R. 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:3711-3715.
- Horst, R.K. and Kawamoto, S.O. 1980. Use of polyacrylamide gel electrophoresis for detection of chrysanthemum stunt viroid in infected tissues. *Plant Dis.* 64:186-188.
- Igloi, G. L. 1983. A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Ann. Biochem.* 134:184-188.
- INEGI. 1995. Boletín de información oportuna del sector alimentario (BIOSA). Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Dirección General de Estadística. Sistema Electrónico de Datos. No. 117, Septiembre. México.
- Keese, P., Osorio-Keese, M.E., and Symons, R.H. 1988. Coconut tinangaja viroid: sequence homology with coconut cadang-cadang viroid and other potato spindle tuber viroid related RNAs. *Virology* 162:508-510.
- Kiefer, M.C., Owens, R.A., and Diener, T.O. 1983. Structural similarities between viroids and transposable genetic elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:6234-6238.
- Klots, L.J. 1973. Color handbook of citrus diseases. University of California. Division of Agricultural Sciences. 122p.
- Kofalvi, S.A., Marcos, J.F., Canizares, M.C., Pallas, V., and Candresse, T. 1977. Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from prunus species: evidence for recombination between HSVd isolates. *J. Gen. Virol.* 78:3177-3186.
- Koltunow, A.M. and Rezaian, M.A. 1988. Grapevine yellow speckle viroid: structural features of a new viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16:849-864.
- Koltunow, A.M. and Rezaian, M.A. 1989. Grapevine viroid 1B, a new member of apple scar skin viroid group contains the left terminal region of tomato planta macho viroid. *Virology* 170:575-578.
- Lafontaine, D.A., Merare, S., Poisson, V., and Perreault, J.-P. 1998. The viroid and viroid-like RNA database. *Nucleic Acids Res.* 26:190-191.
- La Rosa, R., Albanese, G., Azzaro, A., Sesto, F., and Domina, F. 1988. Suitability of nucleic acid analysis to diagnose viroid infections in citrus. In: *Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol.* pp 188-191. L.W. Timmer, S.M. Garnsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Lebedeva, I.V., Ivonovskaia, M.G., Gurinovich, T.I., Gottykh, M.B., Meldrais, I.A., and Shabarova, Z.A. 1993. Design of a universal biotin-containing oligonucleotide diagnostic kit for detecting viroid plant diseases. *Bioorg. Khim* 19:894-904.

- Lee, R.F. 1995. Viroid and dsRNA extraction procedures. Citrus Research and Educational Center (CREC), University of Florida. Mimeo.
- Levy L. and Hadidi A. 1993. Direct nucleotide sequencing of PCR-amplified DNAs of the closely related citrus viroids IIa and IIb (cachexia). In: Proc of the 12<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 180-186. P. Moreno, J.V. da Graça, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- MacKenzie, D.J., McLean, M. A., Mukerji, S., and Green, M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 81:222-226.
- Mallet, F., Oriol, G., Mary, C., Verrier, B., and Mandrand, B. 1995. Continuous RT-PCR using AMV-RT and *Taq* DNA polymerase: Characterization and comparison to uncoupled procedures. *BioTechniques* 18:678-687.
- Mark, C. 1988. DNA Strider. A.C. Program for DNA and protein sequences analysis. Dept. de Biologie. Institute de Recherche Fondamentale.
- Martínez-Soriano, J.P. 1992. Los genes perdidos de los viroides: ¿Una lección de la Fitopatología clásica a la Biología Molecular?. *Revista Mexicana de Fitopatología* 9:156-159.
- Martínez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R., and Diener, T.O. 1996. Mexican papita viroid: putative ancestor of crop viroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:9397-9401.
- Matousek, J. and Rakousky, S. 1993. Antisense DNA inhibits infection of potato spindle tuber viroid. *Folia Biol.* 39:87-99.
- McInnes, J.L., Habili, N., and Symons, R.H. 1989. Nonradioactive, photobiotin-labelled DNA probes for routine diagnosis of viroids in plant extracts. *J. Virol. Meth.* 23:299-312.
- Moreno-Mata, E.G. 1995. Detección molecular del viroide de exocortis de los cítricos. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. 71p.
- Morris, T. J. and Smith, E. M. 1977. Potato spindle tuber disease: Procedures for the detection of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers. *Phytopathology* 67:145-150.
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262:36-43.
- Navarro, B. and Flores, R. 1997. Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: Unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:11262-11267.

- Ochoa, F. 1995. Extracción de RNA viroidal similares a partir de la corteza de cítricos. En: Curso Internacional de Certificación de Cítricos. Venezuela. Mimeografiado.
- Ochoa, F., La Rosa, R., Albanese, G., Tessitori, M., and Fuggetta, E. 1996. Survey of citrus viroids in Venezuela. In: Proc. of the 13<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol. pp 354-356. J.V. da Graça, P. Moreno, and R.K. Yokomi (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T., and Okada, Y. 1983. Hop stunt viroid: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11:6185-6197.
- Owens, R. A. and Diener, T. O. 1981. Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. *Science* 213:670-672.
- Owens, R.A., Smith, D.R. and Diener, T.O. 1978. *Virology* 89:388-394.
- Pallás, V., Navarro, A., and Flores, R. 1987. Isolation of viroid-like RNA from hop different from hop stunt viroid. *J. Gen. Virol.* 68:3201-3205.
- Palukaitis, P., Hatta, T., Alexander, D.E., and Symons, R.H. 1979. Characterization of a viroid associated with avocado sunblotch disease. *Virology* 99:145-151.
- Pfannenstiel, M.A., Slack, S.A., and Lane, L.C. 1980. Detection of potato spindle tuber viroid in field-grown potatoes by an improved electrophoretic assay. *Phytopathology* 70: 1015-1018.
- Podleckis, E.V., Hammond, R.W., Hurtt, S.S., and Hadidi, A. 1993. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labeled dot blot and tissue blot hybridization. *J. Virol. Meth.* 43:147-158.
- Polizzi, G., Albanese, G., Azzaro, A., Davino, M., and Catara, A. 1991. Field evaluation of dwarfing effect of two combinations of citrus viroids on different citrus species. In: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 230-233. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Puchta, H., Ramm, K., Hadas, R., Bar-Joseph M., Luckinger, R., Freimuller, K., and Sängler, H.L. 1989. Nucleotide sequence of a hop stunt viroid (HSVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* 17:1247.
- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hadas, R., Bar-Joseph, M., and Sängler, H.L. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.* 19:6640.
- Puchta, H., Ramm, K., and Sanger, H.L. 1988. The molecular structure of hop latent viroid (HLV), a new viroid occurring worldwide in hops. *Nucleic Acids Res.* 16:4197-4216.

- Rakowski, A.G., Szychowski, J.A., Avena, Z.S., and Semancik, J.S. 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 75:3581-3584.
- Randles, J.W. 1975. Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology* 65:163-167.
- Randles, J.W., Boccardo, G., and Imperial, J.S. 1980. Detection of the cadang-cadang associated RNA in African oil palm and buri palm. *Phytopathology* 70:185-189.
- Randles, J.W., Rillo, E.P., and Diener, T.O. 1976. The viroid-like structure and cellular location of anomalous RNA associated with the cadang-cadang disease. *Virology* 74:128-139.
- Rezaian, M.A. 1990. Australian grapevine viroid –evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* 18:1813-1818.
- Riesner, D. and Gross, H.J. 1985. Viroids. *Ann. Rev. Biochem.* 54:531-564.
- Rivera-Bustamante, R. F., Gin, R., and Semancik, J. S. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Ann. Biochem.* 156:91-95.
- Robles Serna, R. 1985. Presencia de exocortis en los cítricos de Tamaulipas. *Memoria del XII Congreso Nacional de Fitopatología.* Guanajuato, México. pp 38.
- Rocha-Peña, M.A., Martínez-Soriano, J.P. y Byerly-Murphy, K.F. 1995. Viroides de cítricos: Amenaza oculta para la citricultura de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13:146-149.
- Rocha-Peña, M.A. y Padrón Chávez, J.E. 1992. Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza. *Publicación Especial No. 2. Campo Experimental General Terán. INIFAP/SARH.* México. 48p.
- Roistacher, C. N. 1988. The cachexia and xyloporosis diseases of citrus- A review. *In: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol.* pp 116-124. L.W. Timmer, S.M. Gamsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Roistacher, C. N. 1991. *Graft-Transmissible Diseases of Citrus: Handbook for Detection and Diagnosis.* F.A.O., Rome. 286p.
- Roistacher, C.N., Bash, J.A., and Semancik, J.S. 1993. Distinct disease symptoms in *Poncirus trifoliata* induced by three citrus viroids from three specific groups. *In: Proc. of the 12<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 173-179. P. Moreno, J.V. da Graça, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.

- Roistacher, C. N., Calavan, E. C., Blue, R. L., Navarro, L., and Gonzáles, R. 1977. A new more sensitive citron indicator for detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEV). *Plant Dis. Repr.* 53:333-336.
- Roistacher, C. N. and Gamsey, S. M. 1988. Cachexia. *In: Compendium of Citrus Diseases.* pp 38-39. J.O. Whiteside, S.M. Gamsey, and L.W. Timmer (eds.). The American Phytopathological Society. St. Paul, MN.
- Roistacher, C. N., Pehrson, J. E., and Semancik, J. S. 1991. Effect of citrus viroids and the influence of rootstocks on field performance of navel orange. *In: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 234-239. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Roy, B.P., Abouhaidar, M.G., and Alexander, A. 1989. Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTV) in plants. *J. Virol. Meth.* 23:149-156.
- Salibe, A.A. and Moreira, S. 1965. Tahiti lime bark disease is caused by exocortis virus. *In: Proc. of the 3<sup>rd</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol.* pp 143-147. Ed. by W.C. Brice. IOCV, Gainesville, Fl.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- Sánchez-Salas, J.A. 1980. Ocurrencia de exocortis en los cítricos en el estado de Nuevo León y su efecto en una combinación patrón-injerto susceptible. Tesis de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. 42p.
- Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J., and Kleinschmidt, A.K. 1976. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:3852-3856.
- Sano, T., Hataya, T., and Shikata, E. 1988. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Res.* 16:347.
- Sasaki, M. and Shikata, E. 1977. On some properties of hop stunt disease agent, a viroid. *Proc. Japan Acad.* 53B:109-112.
- Schumacher, J., Meyer, N., Riesner, D., and Weidemann, H.L. 1986. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "return"-gel electrophoresis. *J. Phytopathol.* 115:332-343.
- Schumacher, J., Randles, J.W., and Riesner, D. 1983. A two-dimensional electrophoresis technique for the detection of circular viroids and virusoids. *Anal. Biochem.* 135:288-295.

- Semancik, J.S. 1986. Separation of viroid RNAs by cellulose chromatography indicating conformation distinctions. *Virology* 155:39-45.
- Semancik, J.S. 1988. Citrus exocortis disease-1976 to 1986. *In*: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol. pp 136-151. L.W. Timmer, S.M. Gamsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Semancik, J.S. 1991. Viroid purification and characterization. *In*: A handbook for detection and diagnosis of graft-transmissible diseases of citrus. pp 233-248. C.N. Roistacher (ed.). FAO, Rome.
- Semancik, J.S. and Duran-Vila, N. 1991. The grouping of citrus viroids: additional physical and biological determinants and relationships with diseases of citrus. *In*: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 178-188. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Semancik, J.S., Gumpf, D.J., and Bash, J.A. 1991. Interactions among the group II citrus viroids: A potential for protection from the cachexia disease?. *In*: Proc. of the 11<sup>th</sup> Conf. Int. Org. of Citrus Virol. pp 189-195. R.H. Brlansky, R.F. Lee, and L.W. Timmer (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Semancik, J.S., Gumpf, D.J., and Bash, J.A. 1992. Interference between viroids inducing exocortis and cachexia diseases of citrus. *Ann. Appl. Biol.* 121:577-583.
- Semancik, J.S. and Harper, K.L. 1984. Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:4429-4433.
- Semancik, J.S., Morris, T.J., Weathers, L.G., Rordorf, G.F., and Kearns, D.R. 1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology* 63:160-167.
- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., and Duran-Vila, N. 1988a. A new viroid is the causal agent of the citrus cachexia disease. *In*: Proc. of the 10<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol. pp 125-135. L.W. Timmer, S.M. Gamsey, and L. Navarro (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R., and Duran-Vila, N. 1988b. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69:3059-3068.
- Semancik, J. S. and Weathers, L. G. 1972. Exocortis disease: Evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biol.* 237:242-244.
- Shikata, E. 1990. New viroids from Japan. *Seminars in virology* 1:107-115.



- Singh, R. P., Boucher, A., Lakshman, D. K., and Tavantzis, S. M. 1994. Multimeric non-radioactive cRNA probes improve detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *J. Virol. Meth.* 49:221-234.
- Spieker, R.L. 1996. The molecular structure of Iresine viroid, a new viroid species from Iresine herbstii ('beefsteak plant'). *J. Gen. Virol.* 77:2631-2635.
- Spieker, R.L., Haas, B., Charng, Y.-C., Freimuller, K., and Sanger, H.L. 1990. Primary and secondary structure of a new viroid 'species' (CbVd 1) present in the Coleus blumei cultivar 'Bienvenue'. *Nucleic Acids Res.* 18:3998.
- Stasys, R.A., Dry, I.B., and Rezaian, M.A. 1995. The termini of a new citrus viroid contain duplications of the central conserved regions from two viroid groups. *FEBS Lett.* 358:182-184.
- Staub, U., Polivka, H., and Gross, H.J. 1995. Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: Application for sensitive detection of grapevine viroids. *J. Virol. Meth.* 52:209-218.
- Tessitori, M., La Rosa, R., Albanese, G., and Catara, A. 1996. PCR diagnosis of some citrus viroids in field samples. In: Proc. of the 13<sup>th</sup> Conf. Inter. Org. of Citrus Virol. pp 230-235. J.V. da Graça, P. Moreno, and R.K. Yokomi (eds.). IOCV, Riverside, CA.
- Thomas, W. and Mohamed, N.A. 1979. Avocado sunblotch -A viroid disease? *Aust. Plant Pathol.* 8:1-3.
- Utermohlen, J.G. and Ohr, H.D. 1981. A polyacrylamide gel electrophoresis index method for avocado sunblotch. *Plant Dis.* 65:800-802.
- Van Dorst, H.J.M. and Peters, D. 1974. Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands J. Plant Path.* 80:85-96.
- Visvander, J.E., Gould, A.R., Bruening, G.E., and Symons, R.H. 1982. Citrus exocortis viroid: Nucleotide sequence and secondary structure of an Australian isolate. *FEBS Lett.* 137:288-292.
- Walter, B. 1981. Un viroïde de la tomate en Afrique de l' est: Identité avec le viroïde de 'potato spindle tuber'? *C.R. Acad. Sci. Ser III.* 292:537-542.
- Wan Chow Wah, Y.F. and Symons, R.H. 1997. A high sensitivity RT-PCR assay for the diagnosis of grapevine viroids in field and tissue culture samples. *J. Virol. Meth.* 63:57-69.
- Yang, X., Hadidi, A., and Garnsey, S.M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82:279-285.

Yang, X., Yie, Y., Zhu, F., Liu, Y., Kang, L., Wang, X., and Tien, P. 1997. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:4861-4865.

## VIII. APENDICE

### 8.1 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide cachexia

**8.1.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR.** Se tomaron como base los iniciadores reportados por Yang y cols. (1992) cuya secuencia es la siguiente:

HSV-comp. cuya secuencia es complementaria al fragmento 278-259, contiene 20 bases en el siguiente orden: 5'-cgcggcagaggctcagatag-3'.

HSV-homó. Es homólogo al fragmento 279-1, contiene 20 bases y su secuencia es la siguiente: 5'-gatcctctcttgagcccoctc-3'.

Se simuló PCR con las secuencias de los iniciadores y del RNA molde (viroides) además del programa computacional Amplify (Engels, 1993) obteniéndose una buena amplificación con todas las variantes conocidas (GenBank versión 105.0+, abril 1998; internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Fig. 22 y Cuadro 13). Obsérvese que el iniciador homólogo tiene 2 lugares potenciales de apareamiento en la mayoría de las secuencias, sin embargo esta amplificación inespecífica fue superada con un manejo adecuado del programa térmico.

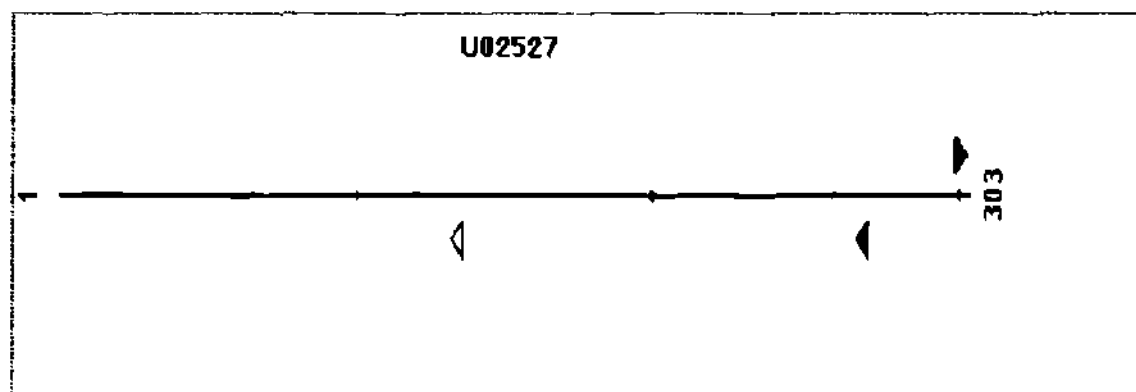


Fig. 22. Simulación de amplificación por PCR del viroide cachexia utilizando la accesión U02527 como secuencia molde, los iniciadores HSV y el programa Amplify.

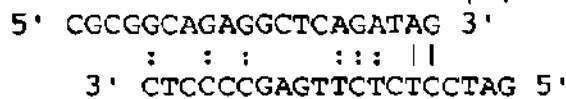
**Cuadro 13. Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide cachexia y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify. comp. significa complementario y homó. homólogo.**

Registro de entrada	HSV-complementario			HSV-homólogo		
	Apareamiento		Desapareamiento (No.)	Apareamiento		Desapareamiento (No.)
	(%)	fragmento		(%)	fragmento	
X00009	100 comp.	278-259	0	100 homó.	279-1	0
X00524	93 comp.	284-265	1	100 homó. 71 comp.	285-1 126-107	0 8
M35717	100 comp.	277-258	0	100 homó.	278-1	0
X06718	93 comp.	283-264	1	100 homó. 71 comp.	284-1 125-106	0 8
X06719	93 comp.	283-264	1	100 homó. 71 comp.	284-1 125-106	0 8
X07405	93 comp.	282-263	1	100 homó. 71 comp.	283-1 125-106	0 8
X12537	100 comp.	278-259	0	99 homó.	279-1	1
X06873	100 comp.	279-260	0	100 homó.	280-1	0
X15330	100 comp.	279-260	0	100 homó.	280-1	0
X13838	100 comp.	280-261	0	100 homó. 71 comp.	281-1 124-105	0 8
D13765 D00480	100 comp.	278-259	0	100 homó.	279-1	0
D13764 D00479	94 comp.	278-259	1	100 homó.	279-1	0
U02527	100 comp.	284-265	0	100 homó. 71 comp.	285-1 126-107	0 8
X69518	93 comp.	280-261	1	100 homó.	281-1	0
X69519	93 comp.	283-264	1	100 homó.	284-1	0
X87924	100 comp.	278-259	0	100 homó.	279-1	0
X87928	100 comp.	279-260	0	100 homó.	280-1	0
X87923	100 comp.	275-256	0	100 homó.	276-1	0
X87925	100 comp.	278-299	0	100 homó.	279-1	0
X87926	100 comp.	279-260	0	100 homó.	280-1	0
X87927	97 comp.	278-259	1	100 homó.	279-1	0
Y08437	94 comp.	280-261	1	100 homó. 71 comp.	281-1 126-107	0 8
Y08438	100 comp.	275-256	0	100 homó.	276-1	0
Y09343	94 comp.	280-261	1	100 homó. 71 comp.	281-1 126-107	0 8
Y09344	94 comp.	280-261	1	100 homó.	281-1	0
Y09345	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09346	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09347	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09348	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09349	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09350	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09351	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y09352	94 comp.	278-259	1	100 homó. 73 comp.	279-1 74-55	0 8
Y14050	91 comp.	278-259	1	100 homó.	279-1	0

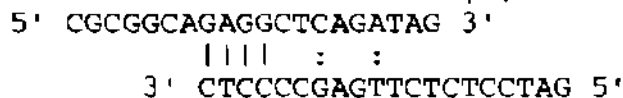
**8.1.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO.**

**Formación de dímeros entre los iniciadores complementario/homólogo:**

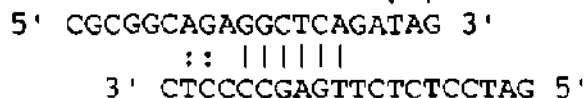
El dímero más estable en 3': 2 pb, -1.6 kcal/mol



El dímero más estable en 3': 4 pb, -6.3 kcal/mol

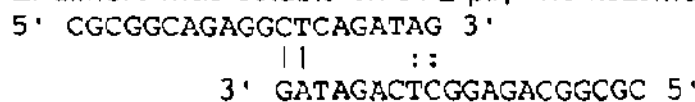


El dímero más estable: 6 pb, -11.3 kcal/mol

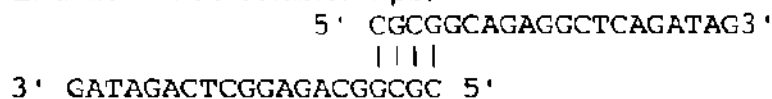


**Formación de duplex con el iniciador HSV-complementario (posición del oligo = 1):**

El dímero más estable en 3': 2 pb, -1.6 kcal/mol

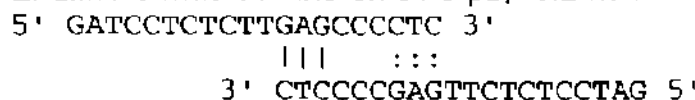


El dímero más estable: 4 pb, -10.3 kcal/mol

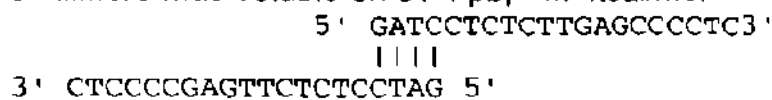


**Formación de duplex con el iniciador HSV-homólogo (posición del oligo = 1):**

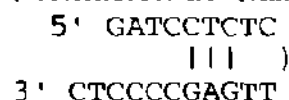
El dímero más estable en 3': 3 pb, -3.2 kcal/mol



El dímero más estable en 3': 4 pb, -4.7 kcal/mol



**Formación de 'hairpin':  $\Delta G = 1.3$  kcal/mol, Loop = 4 nt**



### 8.1.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO

#### HSVd-complementario

Upper Primer, 20-mer [1]:  
 Td = 70.0° [nearest neighbor method]  
 Tm = 74.4° [%GC method]  
 Tm = 66° [2°\*(A+T) + 4°\*(G+C) method]  
 Mr = 6272 k [one strand]  
 Mr = 12.4 k [two strands]  
 µg/OD = 45.6 [dsDNA]

Base	Number	and %
A	5	[25.0]
C	5	[25.0]
G	8	[40.0]
T	2	[10.0]
A + T	7	[35.0]
G + C	13	[65.0]

#### DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	(0.006)	24.6	18.1	-7.9
10	(0.06)	41.2	34.7	8.7
50	(0.3)	52.8	46.3	20.3
165	( 1 )	61.4	54.9	28.9
330	( 2 )	66.4	59.9	33.9
500	( 3 )	69.4	62.9	36.9
1000	( 6 )	74.4	67.9	41.9

Approximate Tm of the mismatched oligo:

$$T_m = T_d - 1.2 * (\% \text{ mismatch})$$

(0) 70.0°; (1) 64.0°; (2) 58.0°; (3) 52.0°; (4) 46.0°

### HSVd-homólogo

Lower Primer, 20-mer [1]:

Td = 64.3° [nearest neighbor method]

Tm = 72.3° [%GC method]

Tm = 64° [2°\*(A+T) + 4°\*(G+C) method]

Mr = 6060 k [one strand]

Mr = 12.4 k [two strands]

µg/OD = 46.1 [dsDNA]

Base	Number	and %
A	2	[10.0]
C	9	[45.0]
G	3	[15.0]
T	6	[30.0]
A + T	8	[40.0]
G + C	12	[60.0]

### DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	(0.006)	22.5	16.0	-10.0
10	(0.06)	39.1	32.6	6.6
50	(0.3)	50.8	44.2	18.2
165	( 1 )	59.3	52.8	26.8
330	( 2 )	64.3	57.8	31.8
500	( 3 )	67.3	60.8	34.8
1000	( 6 )	72.3	65.8	39.8

Approximate Tm of the mismatched oligo:

Tm = Td - 1.2\*(% mismatch)

(0) 64.3°; (1) 58.3°; (2) 52.3°; (3) 46.3°; (4) 40.3°

**8.1.4 Características de dilución de los iniciadores.** Los iniciadores utilizados fueron sintetizados por la compañía Biosynthesis Inc. y fueron diluidos para su uso en PCR de acuerdo con el esquema de la Figura 23.

HSV-complementario, 20 bases, complementario al fragmento 259-278 de la secuencia del viroide. Secuencia: 5'-cgc ggc aga ggc tca gat ag-3' PM 6192.  
 HSV-homólogo, 20 bases, homólogo al fragmento 279-1 de la secuencia del viroide. Secuencia: 5'-gat cct ctc ttg agc ccc tc-3' PM 5980

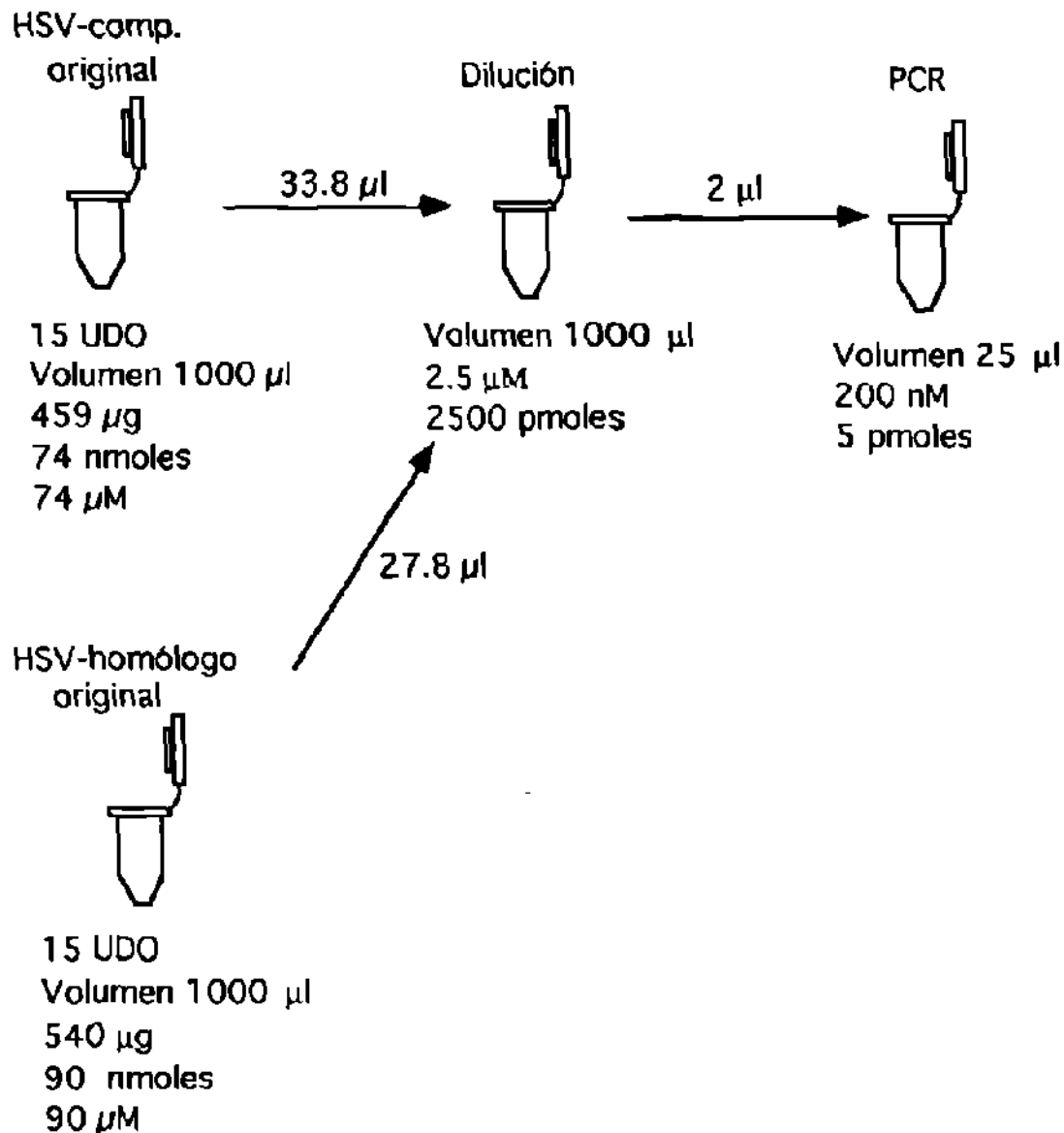


Fig. 23. Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide cachexia.



## 8.2 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide exocortis

**8.2.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR.** Se utilizaron como base los iniciadores reportados por Yang y cols. (1992) cuya secuencia es la siguiente:

CEV-comp. (complementario 90-71), 20-bases, secuencia 5'-ccctgaaggacttctcccc-3'  
 CEV-homó. (homólogo 91-114), 24-bases, secuencia 5'-atccccggggaaacctggaggaag-3'.

Al simular PCR con los iniciadores anteriores, las secuencias molde conocidas y el programa computacional Amplify se observó una buena amplificación, pero con formación de dímeros (Fig. 24).

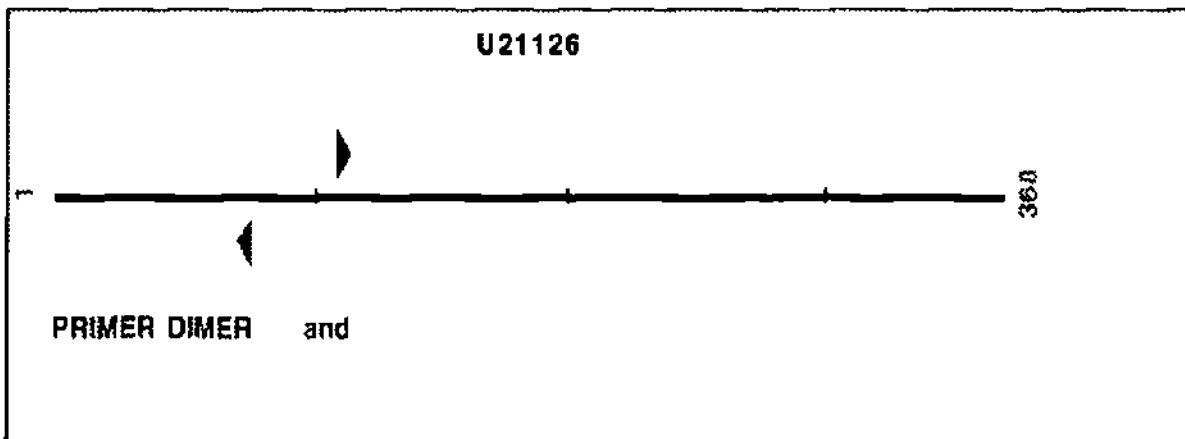


Fig. 24. Simulación de amplificación por PCR del viroide exocortis utilizando la accesión U21126 como secuencia molde, los iniciadores CEV y el programa Amplify.

Dímeros entre iniciadores, calidad = 4

```

CEV-homólogo      5'      ATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAG.....3'
                        | | | | |
CEV-complementario 3'      .....CCCCTTCTTCAGGAAGTCCC      5'
    
```

Con base en lo anterior se decidió eliminar la G de la posición 3' del iniciador CEV-homólogo y se verificó la capacidad de amplificación de los iniciadores con las 18 secuencias de exocortis disponibles en el Banco de Genes (GenBank, versión 105.0+, abril 1998; internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), obteniéndose muy buena amplificación (Cuadro 14).

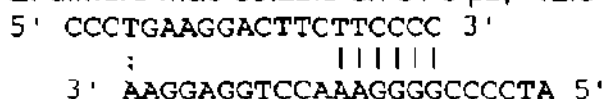
**Cuadro 14.** Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide exocortis y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify. comp. significa complementario y homó. homólogo.

Registro de entrada	CEV-complementario			CEV-homólogo		
	Apareamiento		Desapareamiento	Apareamiento		Desapareamiento
	(%)	fragmento	(No.)	(%)	fragmento	(No.)
U21126	100 comp.	89-70	0	100 homó.	90-112	0
J02053	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
K00964	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
K00965	100 comp.	90-71	0	99 homó.	91-113	1
M30868	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
M34917	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
M30871	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
M30869	100 comp.	89-70	0	100 homó.	90-112	0
M30870	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
X53716 S50398	100 comp.	92-73	0	100 homó.	93-115	0
S67437	100 comp.	89-70	0	100 homó.	90-112	0
S67438	100 comp.	89-70	0	100 homó.	90-112	0
S67440	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
S67441	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
S67442	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
S67446	100 comp.	89-70	0	100 homó.	90-112	0
S79831	100 comp.	90-71	0	100 homó.	91-113	0
Y00328	100 comp.	88-69	0	100 homó.	89-111	0

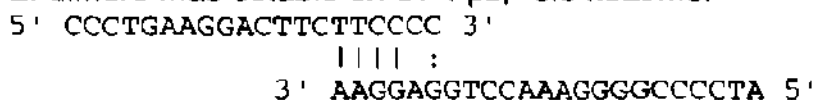
**8.2.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO.**

**Dímeros entre los iniciadores CEV-complementario y CEV-homólogo**

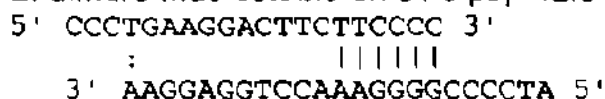
El dímero más estable en 3': 6 pb, -12.8 kcal/mol



El dímero más estable en 3': 4 pb, -6.6 kcal/mol

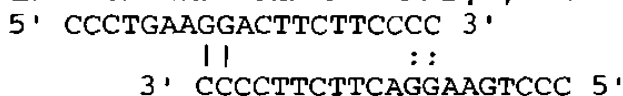


El dímero más estable en 3': 6 pb, -12.8 kcal/mol

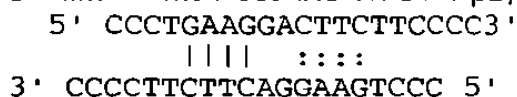


### Formación de duplex con el iniciador CEV-complementario

El dímero más estable en 3': 2 pb, -3.1 kcal/mol

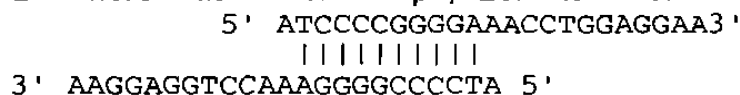


El dímero más estable en 3': 4 pb, -5.1 kcal/mol



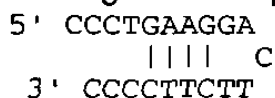
### Formación de duplex con el iniciador CEV-homólogo

El dímero más estable: 10 pb, -25.4 kcal/mol

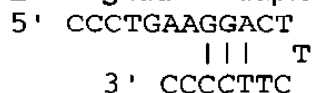


### Formación de 'hairpin' con el iniciador CEV-complementario

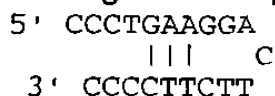
1. Longitud del duplex = 4 pb;  $\Delta G = -0.7$  kcal/mol; Lazo= 5 nucleótidos



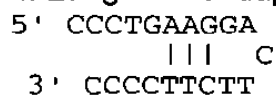
2. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = -0.3$  kcal/mol; Lazo= 5 nucleótidos



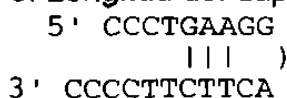
3. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = 0.6$  kcal/mol; Lazo= 7 nucleótidos



4. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = 0.9$  kcal/mol; Lazo= 5 nucleótidos



5. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = 1.0$  kcal/mol; Lazo = 4 nucleótidos



**Formación de 'hairpin' con el iniciador CEV-homólogo**

1. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = -0.2$  kcal/mol; Lazo= 4 nucleótidos

5' ATCCCC  
   ( ( ( )

3' AAGGAGGTCCAAAGGGG

2. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = 0.2$  kcal/mol; Lazo= 12 nucleótidos

5' ATCCCCGGGG  
   ( ( ( )

3' AAGGAGGTCCAAA

3. Longitud del duplex = 3 pb;  $\Delta G = 1.1$  kcal/mol; Lazo = 15 nucleótidos

5' ATCCCCGGGGGA  
   ( ( (        A

3' AAGGAGGTCCA

**8.2.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO**

**Iniciador CEV-complementario, 20-bases:**

Td = 66.7° [nearest neighbor method]  
 Tm = 72.3° [%GC method]  
 Tm = 64° [2°\*(A+T) + 4°\*(G+C) method]  
 Mr = 6069 k [one strand]  
 Mr = 12.4 k [two strands]  
 µg/OD = 46.1 [dsDNA]

Base	Number	and %
A	3	[15.0]
C	9	[45.0]
G	3	[15.0]
T	5	[25.0]
A + T	8	[40.0]
G + C	12	[60.0]

**DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]**

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	(0.006)	22.5	16.0	-10.0
10	(0.06)	39.1	32.6	6.6
50	(0.3)	50.8	44.2	18.2
165	( 1 )	59.3	52.8	26.8
330	( 2 )	64.3	57.8	31.8
500	( 3 )	67.3	60.8	34.8
1000	( 6 )	72.3	65.8	39.8

**Approximate Tm of the mismatched oligo:**

Tm = Td - 1.2\*(% mismatch)  
 (0) 66.7°; (1) 60.7°; (2) 54.7°; (3) 48.7°; (4) 42.7°

**Iniciador CEV-homólogo, 23-bases:**

Td = 78.8° [nearest neighbor method]  
 Tm = 77.1° [%GC method]  
 Tm = 74° [2°\*(A+T) + 4°\*(G+C) method]  
 Mr = 7188 k [one strand]  
 Mr = 14.2 k [two strands]  
 µg/OD = 45.6 [dsDNA]

Base	Number	and %
A	7	[30.4]
C	6	[26.1]
G	8	[34.8]
T	2	[8.7]
A + T	9	[39.1]
G + C	14	[60.9]

**DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations [°C]**

[mM]	xSSC	0%	10%	50%
1	(0.006)	27.3	20.8	-5.2
10	(0.06)	43.9	37.4	11.4
50	(0.3)	55.5	49.0	23.0
165	( 1 )	64.1	57.6	31.6
330	( 2 )	69.1	62.6	36.6
500	( 3 )	72.1	65.6	39.6
1000	( 6 )	77.1	70.6	44.6

Approximate Tm of the mismatched oligo:

$$T_m = T_d - 1.2 * (\% \text{ mismatch})$$

(0) 78.8°; (1) 73.6°; (2) 68.4°; (3) 63.2°; (4) 58.0°

**8.2.4 Características de dilución de los iniciadores.** La Figura 25 muestra las características de los iniciadores usados para la detección del viroide exocortis, y su forma de dilución.

CEV-complementario, 20 bases, complementario al fragmento 90-71 de la secuencia del viroide. Secuencia 5´-ccc tga agg act tct tcc cc-3´ PM 5989.  
 CEV-homólogo, 23 bases, homólogo al fragmento 91-113 de la secuencia del viroide. Secuencia: 5´-atc ccc ggg gaa acc tgg agg aa-3´ PM 7108.

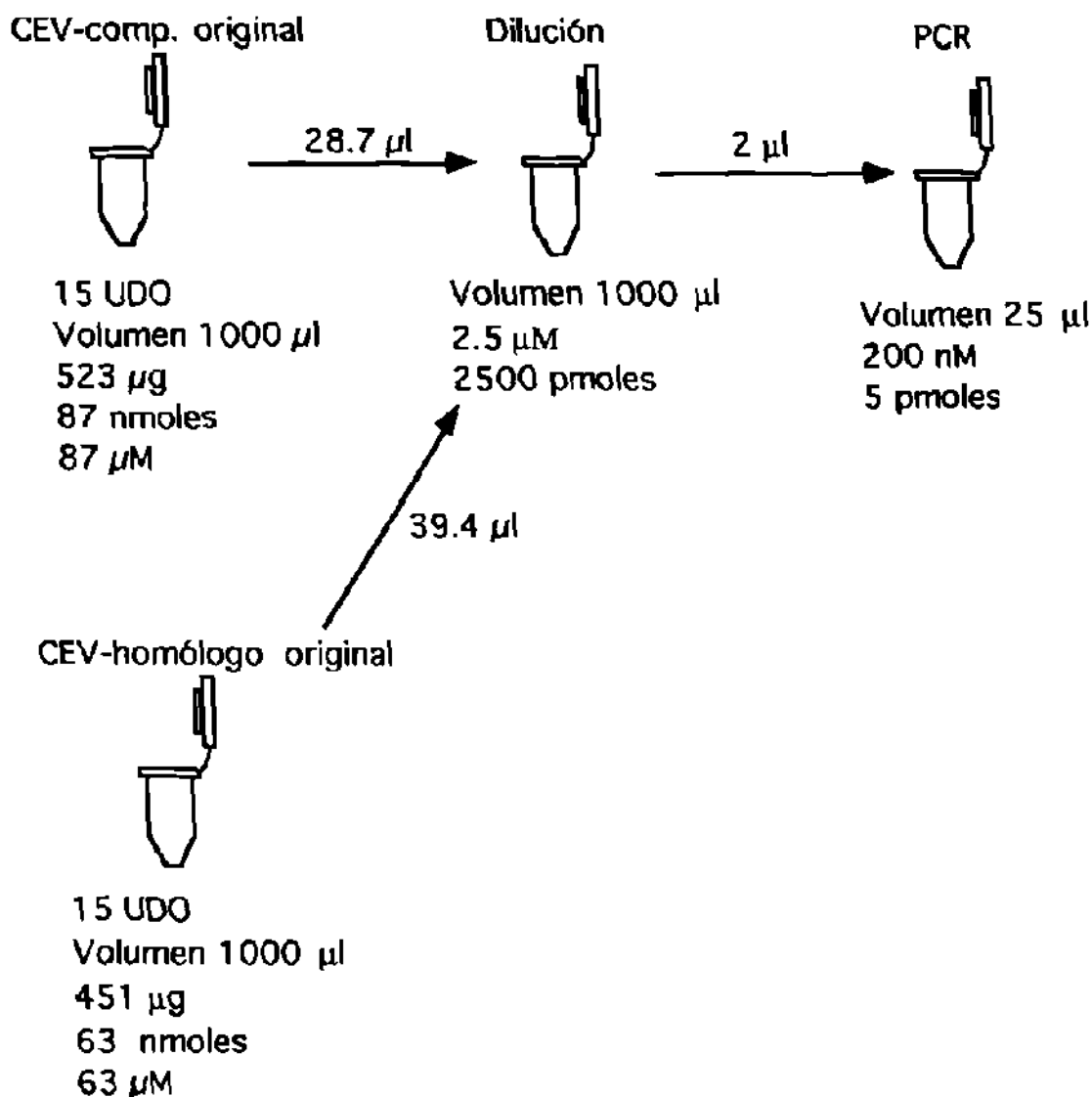


Fig. 25. Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide exocortis.

8.3 Mapa gráfico de restricción de los viroides cachexia y exocortis de los cítricos

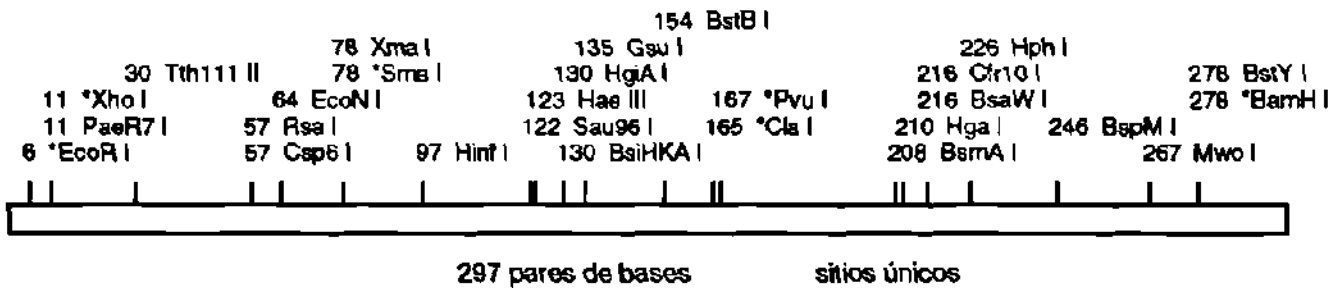


Fig. 26. Mapa gráfico de restricción del viroide cachexia simulado con el programa DNA Strider.

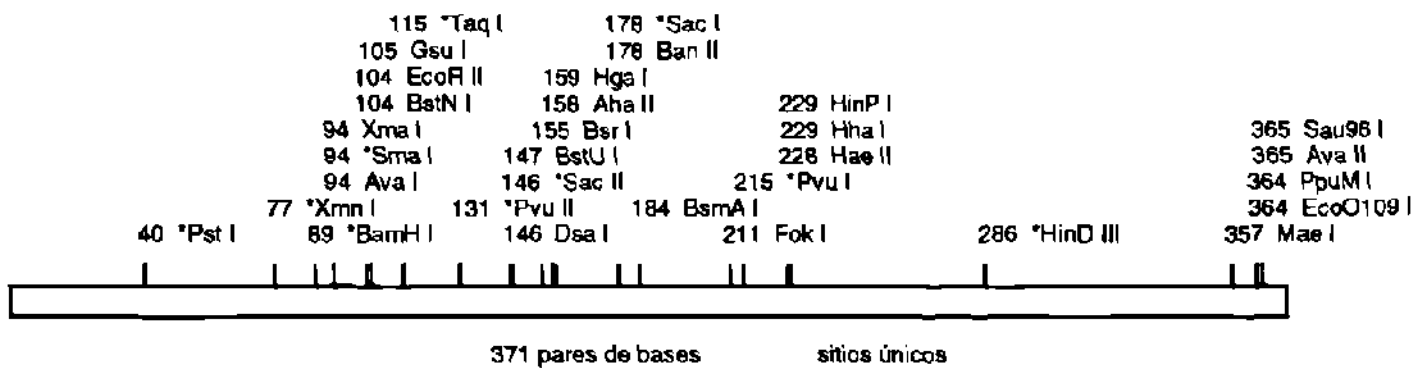


Fig. 27. Mapa gráfico de restricción del viroide exocortis simulado con el programa DNA Strider.

