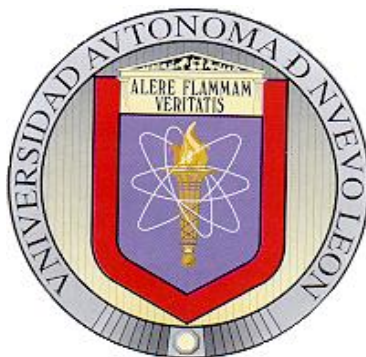


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**DETECCIÓN E INCIDENCIA DE VIROIDES EN CÍTRICOS MEDIANTE
TÉCNICAS MOLECULARES EN ZONAS PRODUCTORAS DEL NORESTE DE
MÉXICO**

Por

CÉSAR ENRIQUE GUERRERO GÁMEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS**

Gral. Escobedo, N.L. junio del 2014

**DETECCIÓN E INCIDENCIA DE VIROIDES EN CÍTRICOS MEDIANTE
TÉCNICAS MOLECULARES EN ZONAS PRODUCTORAS DEL NORESTE DE
MÉXICO**

Aprobación

Comité Particular de Tesis

Dr. Omar G. Alvarado Gómez

DIRECTOR DE TESIS

Dra. María Genoveva Álvarez Ojeda

CO-DIRECTOR

Dr. Jorge Ariel Torres Castillo

ASESOR

Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón

ASESOR

Dr. Ramiro González Garza

ASESOR

Dr. Mauricio Luna Rodríguez

ASESOR



Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS

DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**DETECCIÓN E INCIDENCIA DE VIROIDES EN CÍTRICOS MEDIANTE
TÉCNICAS MOLECULARES EN ZONAS PRODUCTORAS DEL NORESTE DE
MÉXICO**

Aprobación

Comité de Exámen

Dr. Omar G. Alvarado Gómez

PRESIDENTE

Dr. Jorge Ariel Torres Castillo

SECRETARIO

Dra. María Genoveva Álvarez Ojeda

VOCAL

Dr. Hazael Gutiérrez Mauleón

VOCAL

Dr. Ramiro González Garza

VOCAL

Dr. Ernesto Javier Sánchez Alejo

SUBDIRECTOR DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por la oportunidad de realizar el proyecto de investigación para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, por el financiamiento del presente proyecto de investigación en conjunto con a la Fundación Produce Tamaulipas bajo la clave: PRECI 3557449A.

Al Proyecto Fortalecimiento de Cuerpos Académicos de la SEP por el financiamiento del Proyecto y al laboratorio Biociencia S. A. de C. V. por facilitar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación

A la Doctora y amiga Ma. Genoveva Alvarez Ojeda del INIFAP, por todo su apoyo incondicional, por todos sus consejos y que siempre estuvo al pendiente de todos mis avances dentro del doctorado, por ser no solo mi asesora, por ser una excelente colega y amiga.

Gracias al Doctor Omar Guadalupe Alvarado Gómez, por ser mi asesor principal en el proyecto de investigación y su por su apoyo.

Al Doctor Jorge Ariel Torres, por todos sus consejos, por demostrarme la calidad de un profesionista que se dedica a la investigación.

Dr. Ramiro González Garza, por todo su apoyo incondicional en todo mi proceso del doctorado y siempre alentarme a seguir adelante dentro del campo de la investigación, por todas sus enseñanzas.

Agradezco a la Dra. Adriana Gutiérrez Diez jefa del laboratorio de Biotecnología por permitirme utilizar el equipo, la asesoría y su valiosísima ayuda en una parte de mi proyecto.

Al Dr. Victor Aguirre por las facilidades otorgadas en el laboratorio de Ciencia Naturales y así lograr terminar el proyecto de investigación.

Dr. Hazael Gutiérrez Mauleon, por su apoyo en los momentos que lo he necesitado así como en su asesoría dentro del campo profesional.

Dr. Ricardo Flores y Dr. Pedro Serra de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia España, por darme la oportunidad de realizar mi estancia en la universidad y apoyarme en parte de mi proyecto de doctorado, con entrenamiento en técnicas y procedimientos de detección, además de su gran hospitalidad.

Dra. Nuria Duran Vila, del instituto IVIA de Valencia, España, por todo su apoyo incondicional, entrenamiento y sus enseñanzas en base a técnicas y protocolos para detección de viroides en cítricos, además de su más grandiosa hospitalidad.

A mis compañeros y maestros dentro y fuera de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo incondicional y por todos los momentos gratos que lograron hacer mi estancia dentro del doctorado lo mas ameno posible.

Gracias a David Antonio Flores Saucedo, por acompañarme en parte de mí proyecto, Erika Garza Murga, Fatima Rivera Soto, Señora Blanca Nora, Miguel Angel, Zaira González, Luis Moreno, Juan Carlos Niño, compañeros y amigos de Biociencia S. A. de C. V. por todos sus consejos y apoyo incondicional y comprensión en todo el proceso del proyecto de investigación.

DEDICATORIA

*Se lo dedico a mi madre Enriqueta Gámez Martínez, mi padre Leobardo Guerrero González por darme la vida, ser mi apoyo y sustento principal, son mi vida ya que los amo tanto, que sin ellos no hubiera llegado hasta donde estoy, que a pesar de las adversidades siempre me han enseñado a que siempre hay que salir adelante, a nunca darme por vencido, a siempre tener humildad con las demás personas, a respetar todo lo que hay a mi alrededor.
Gracias Mamá, Gracias Papá, por siempre estar ahí Los Amo.*

A mis hermanos y hermana, mi sobrina y sobrino. Los quiero mucho.

A la memoria de mi hermano (+) Leobardo Guerrero Gámez (+) que siempre nos protege desde los confines del universo y donde quiera que te encuentres, tu que fusite siempre mi ejemplo a seguir, cumplo uno de lo que se, seria tu mas grande anhelo y deseo que es obtener el grado de Doctor en Ciencias, te queremos, amamos y extrañamos mucho, mi gran hermano mayor. Te quiero mucho.

A mis tias y tios, primos, primas que a pesar de la distancia nos une la sangre y el alma.

CONTENIDO

Capítulo	Página
Agradecimientos	IV
Dedicatoria	VI
Contenido	VII
Resumen General	IX
Abstract	X
Abreviaturas y Simbología	XI
Capítulo 1. Viroides de los cítricos	1
1.1. Resumen	1
1.2. Summary	1
1.3. Descubrimiento, clasificación y nomenclatura	2
1.4. Estructura, replicación, movimiento	3
1.5. Enfermedades y expresión de síntomas	7
1.6. Transmisión y epidemiología	8
1.7. Regulación e impacto económico.	9
1.8. Bibliografía	10
Capítulo 2. Detección de viroides de los cítricos por electroforesis secuencial	12
2.1. Resumen	12
2.2. Summary	12
2.3. Introducción	13
2.4. Materiales y Métodos	15
2.5. Resultados y Discusión	16
2.6. Conclusiones	17
2.7. Bibliografía	17
Capítulo 3. Detección por RT-PCR punto final y tiempo real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México	20
3.1. Resumen	20
3.2. Summary	20
3.3. Introducción	21
3.4. Materiales y Métodos	23
3.5. Resultados y Discusión	26
3.6. Conclusiones	29
3.7. Bibliografía	30
Capitulo 4. Detección del viroide achaparramiento de los cítricos por qRT-PCR con sondas Taq Man en muestras de cítricos del noreste de México	33
4.1. Resumen	33
4.2. Summary	33

Capítulo	Página
4.3. Introducción	34
4.4. Materiales y Métodos	35
4.5. Resultados y Discusión	38
4.6. Conclusiones	40
4.7. Bibliografía	41
Capítulo 5. Clonación y secuenciación de tres viroides de cítricos	43
5.1. Resumen	43
5.2. Summary	43
5.3. Introducción	43
5.4. Materiales y Métodos	45
5.5. Resultados y Discusión	47
5.6. Conclusiones	52
5.7. Bibliografía	52
Capítulo 6. Detección de viroides de cítricos por hibridación de RNA	55
6.1. Resumen	55
6.2. Summary	55
6.3. Introducción	55
6.4. Materiales y Métodos	58
6.5. Resultados y Discusión	60
6.6. Conclusiones	62
6.7. Bibliografía	62
Resumen Curricular	64

RESUMEN GENERAL

La familia de las Rutáceas son un grupo de plantas importantes en México, destacando aquellas especies pertenecientes al género *Citrus*, por su consumo elevado. Entre las enfermedades importantes en la citricultura mundial están las ocasionadas por los viroides de los cítricos, siendo los principales agentes causales el viroide exocortis de los cítricos (CEVd) y el viroide cachexia de los cítricos (HSVd), descubiertos en los años de 1972 y 1977 respectivamente. En México hay muy pocos trabajos de investigación publicados sobre viroides de los cítricos, menos aún sobre el viroide del enanismo (CDVd), y ninguno de ellos sobre los viroides IV y V (CVd-IV y CVd-V). En la presente investigación se realizó un estudio de las 5 especies de viroides de los cítricos en huertas representativas dedicadas a la producción de estos cultivos en la región noreste de México. Primeramente se utilizó la técnica de electroforesis secuencial, la cual se conoce desde los años 80's, y posteriormente la técnica RT-PCR que es la que se utiliza actualmente en México en los programas de certificación de cítricos libres de viroides, pero debido a las inconsistencias en los resultados por la dependencia con las especies de cítricos analizadas y con la época del año de los muestreos, así como la distribución irregular de las moléculas de los viroides dentro de la planta, se utilizó también la secuenciación de ADN y se realizaron comparaciones con secuencias de los aislamientos reportados en el Banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos. También se implementó la hibridación de ARN con sondas no radioactivas para la detección e identificación de tres viroides (CEVd, HSVd y CDVd), y se implementó el análisis de RT-PCR tiempo real utilizando sondas TaqMan^{MR} y sondas marcadas con Sybr-Green^{MR}. Por último se hizo una evaluación de la incidencia de los viroides de los cítricos en 7 huertas de campo localizadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

ABSTRACT

The Rutaceae family is a group of important crops in Mexico, highlighting those plants belonging to the Citrus genus, its high consumption. Of the major diseases in the citrus industry are caused by viroids, the main causative agents are citrus exocortis and citrus cachexia viroid discovered in 1972 and 1977 years respectively. In Mexico there are little published research on citrus viroids and none of them includes the study of viroids IV and V. In this research we made a study of all five species of citrus viroids in representative orchards in the production areas of these crops in northeast of Mexico. First we used the sequential electrophoresis technique, which start on 80's, and then used the RT-PCR which is currently used in Mexico in free of citrus viroids certification programs but the results have not been very consistent, and that there have been some problems in its implementation, depending on the species of citrus analyzed and the season of sampling, as well as a irregular distribution of viroids inside the plant, we also used the DNA sequencing and comparing with sequences from GenBank of the National Center of Biotechnology Information. We also work with RNA hybridization using non isotopic probes dig-labeled for detection of three citrus viroids (CEVd, HSVd and CDVd). We also implemented real-time RT-PCR using TaqMan probes and Sybr-Green. Finally we determined the incidence of citrus viroids in field orchards located on Nuevo Leon and Tamaulipas region.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AgNO₃	Nitrato de plata
Anti-Dig	Anticuerpo de detección de digoxigenina
ARN	Ácido ribonucleico
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato
C	Region central del genoma del viroide
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
CBCVd	Viroide causante de la corteza agrietada de los cítricos
CBLVd	Viroide causante de la hoja doblada de los cítricos
CCaVd	Viroide causante de la cachexia de los cítricos
CCR	Region central concervada del genoma del viroide
CDVd	Viroide causante del enanismo de los cítricos
CEVd	Viroide causante de la exocortis de los cítricos
CVd-V	Viroide cinco de los cítricos
CF-11	Celulosa
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
cRNA	RNA complementario
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTP's	Dinucleotidos trifosfatados
Dot-Blot	Técnica de hibridación de ácidos nucleicos
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
X g	Gravedades
HSVd	Viroide del enanismo del lúpulo
INIFAP	Instituto Nacional de Investigación Forestal y Agropecuaria
IOCV	Organización internacional de virólogos en cítricos
LB	Medio de cultivo a base de triptona, extracto de levadura y cloruro de sodio
M	Molar
min	minutos
ml	mililitros
mM	Milimolar
M-MLV	Enzima del Virus de Leucemia Murina Moloney
MR.	Marca registrada
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidroxido de sodio
NBT	nitro-blue tetrazolium
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
ng	Nanogramos
NOM	Norma Oficial Mexicana
nt	Nucleótidos
P	Region patogénica del genoma del viroide
P-GEMT	Vector plasmido para clonación

pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLMVd	<i>Viroide del mosaico latente del durazno</i>
pp.	Páginas
PSTVd	Viroide del tubérculo fusiforme de la papa
qRT-PCR	Sistema de detección molecular en tiempo real y cuantitativo
RNAsa	Ribonucleasa
RNAsin	Inibidor de ribonucleasas
RT	Transcripción inversa
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación
SDS	Duodecil sulfato de sodio
Senasica	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
sPAGE	Electroforesis secuencial
SSC	
TAE	Solución amortiguadora a base de Tris, acetato de sodio y Na₂EDTA
Taq	Enzima termoestable que polimeriza ADN, proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TaqMan	Sistema de detección y cuantificación de ácido nucleico con base en una sonda marcada con un flouorforo
TBE	Solución amortiguadora a base de Tris, ácido bórico y Na₂EDTA
TCH	Orquilla terminal conservada del genoma del viroide
TCR	Region terminal conservada del genoma del viroide
TEMED	Tetrametiletildiamina
T_L	Región terminal izquierda del genoma del viroide
T_R	Región terminal derecha del genoma del viroide
Trizol	Solución de extracción de ácido ribonucleico
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
USDA	Departamento de Agricultura de E.U.
V	Region variable del genoma del viroide
X	Número de veces de la concentración original
μl	microlitro
μg	microgramo
μM	micromolar
°C	Grados centígrados
%	Por ciento

CAPÍTULO 1

Viroides de los cítricos

1.1. Resumen

Entre las enfermedades importantes en la citricultura mexicana están las ocasionadas por los viroides. El primer viroide descubierto en hospederos cítricos lo hizo Semancik en 1971 y se le llamó viroide exocortis de los cítricos (CEVd); posteriormente en 1972 se descubrió el viroide causante de la cachexia (HSVd), luego los viroides I, III y IV (CVd-I, CVd-III y CVd-IV), y mas recientemente el viroide V (CVd-V). Estos agentes causales de enfermedades se han clasificado dentro de la familia Pospiviroidae, la cual cuenta con cuatro generos reconocidos entre los viroides que se hospedan en cítricos. Los ensayos en plantas indicadoras como son la cidra etrog y *Gynura aurantiaca* fueron las primeras técnicas de detección de viroides en cítricos, sin embargo la técnica RT-PCR es la que se utiliza actualmente en México en los programas de certificación de cítricos libres de viroides. Otras técnicas moleculares como la secuenciación, hibridación y la electroforesis secuencial se han utilizado también para la detección, identificación y caracterización de los viroides de los cítricos permitiendo conocer su estructura molecular y su forma de acción en conjunto con el mecanismo de replicación de la celula vegetal. La sintomatología que causan los viroides en los hospederos cítricos son agrietamientos, epinastia, enanismos y acumulación de goma, entre otros; su transmisión, distribución y epidemiología dependerán de las condiciones en las cuales se desarrollan los cultivos hospedantes, asi como el tipo de especies y variedades de cítricos, y las combinaciones de patrón e injerto que estos infecten, asi como de los programas prevención basados en la certificación de yemas.

Palabras clave: viroides de cítricos, RT-PCR, hibridación, electroforesis secuencial, secuenciación

1.2. Summary

Of the major diseases in the Mexican citrus are caused by viroids. The first citrus viroid discovered was exocortis (CEVd). It was discovered by Semancik in 1971; after that, in 1972 it was discovered the citrus cachexia viroid (HSVd), and then citrus viroid I, III, IV

and V (CVd-I, CVd-III, CVd-IV and CVd-V). These diseases causal agents have been classified within the Pospiviroidae family, which has four recognized genus. Testing techniques in plants such as etrog citron and *Gynura aurantiaca* were the first viroids detection techniques used in citrus, however the RT-PCR is currently used in Mexico certification programs of citrus. Other molecular techniques such as sequencing, hybridization and the sequential electrophoresis have also been used for the detection, identification and characterization of citrus viroids giving us the knowledge of the molecular structure and the action mode together with the replication mechanism in the plant cells. The symptoms of the citrus viroids on hosts are bark cracking, epinasty, dwarfing, gumming and others; their transmission, distribution and epidemiology depend of the wheater conditions as well as the citrus species, varieties and the rootstock/graft combination and by prevention programs based on certification of plants.

Keywords: citrus viroids, RT-PCR, RNA hybridation, secuential PAGE, DNA secuencing.

1.3. Descubrimiento, clasificación y nomenclatura

Reportes históricos de la enfermedad exocortis, descrita en 1948 en árboles injertados sobre naranja trifoliada y lima Rangpour, y la observación de síntomas de enanismo y agrietamiento sugirieron la presencia de un nuevo patógeno transmisible. Posteriormente el desarrollo de los bieonsayos en plantas indicadoras y la observación de síntomas como epinastia y rugosidad evidenciaron que la enfermedad era causada por el agente de la exocortis de los cítricos. Sin embargo en 1972 Semansik y Weathers con base en la movilidad en geles de poliacrilamida concluyeron que el agente causal de la exocortis de los cítricos se trataba de una molecula de ARN de bajo peso molecular parecida al viroide causante del tubérculo fusiforme de la papa, PSTVd descrito un año antes (Diener 1979 y Duran Vila *et al*, 1988).

Utilizando métodos avanzados de detección, en 1986 con la cromatografía en celulosa CF-11 y métodos de hibridación de ácidos nucleicos específicos fueron caracterizados varios viroides de cítricos en Estados Unidos de America y España, reportando de manera física y biológica la presencia de los viroides y su relación con las enfermedades de la exocortis y la cachexia de los citrcos (Duran Vila *et al*, 1988).

Dentro de la familia Pospiviroidae se encuentran 4 géneros representativos los cuales se distinguen por medio de dos criterios: el primero depende de la secuencia de la estructura de la región central conservada (CCR) y el segundo criterio trata sobre la presencia o la ausencia de dos puntos conservados que son: la región terminal conservada (TCR) la cual se encuentra en todos los miembros del género *Pospiviroidae* y *Apscaviroidae*, además de dos miembros del género *Coleviroidae*; y la orquilla terminal conservada (TCH) la cual se encuentra en el *viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd) y en todos los miembros del género *Cocadviroidae*, Cuadro 1 (Hadidi *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Clasificación de los viroides de cítricos.

Familia	Genero	Especie
Pospiviroidae	Pospiviroidae	<i>Viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd)</i>
	Hostuviroidae	<i>Viroide de la cachexia de los cítricos (HSVd, sinónimos CCaVd y CVd-II)</i>
	Cocaviroidae	<i>Viroide de la corteza agrietada de los cítricos (CBCVd, sinónimo CVd-IV)</i>
		<i>Viroide del enanismo de los cítricos (CVd-III)</i>
	Apscaviroidae	<i>Viroide de la hoja doblada de los cítricos (CBLVd, sinónimo CVd-I)</i>

1.4. Estructura, replicación y movimiento

Los viroides de los cítricos son moléculas de ARN circular cerradas covalentemente con un tamaño entre 246 y 399 bases nucleotídicas. Dichas moléculas no codifican para ningún péptido o proteína, estos tienden a utilizar las proteínas de los hospederos para sus funciones biológicas como son: la replicación, procesamiento y transporte. Además estas moléculas pueden ser consideradas como un mínimo parásito de la maquinaria del hospedero. Para actuar como parásito, los viroides presentes en el hospedero requieren la maquinaria apropiada que está basada sobre su secuencia o la estructura del ARN del viroide (Serra, 2009)

Las herramientas de la biología molecular como la clonación y secuenciación de fragmentos de ácidos nucleicos, además del análisis estructural, muestra que los viroides pueden adoptar estructuras secundarias en forma de varilla y ramificada con cinco dominios: central (C), patogénica (P), Variable (V) y la región terminal derecha (T_R) e izquierda (T_L), e identificando tres motivos que son: 1) la región central conservada (CCR) formado por dos conjuntos de residuos en la parte superior e inferior de la cadena; 2) la región terminal conservada (TCR), localizado en la parte superior de la cadena del dominio derecho terminal y 3) la horquilla terminal conservada (TCH), la cual se encuentra al final del dominio terminal derecho y conserva no solo la secuencia, sino además la estructura secundaria. La secuencia de la región central conservada (CCR) y la presencia o ausencia de los motivos de la región terminal conservada (TCR) y de la horquilla terminal conservada (TCH) son características de 25 viroides de la primera familia nombrada Pospiviroides a la cual pertenecen los viroides de los cítricos (Flores, 2001, Flores *et al.* 2004).

La estructura estable de muchos viroides consiste de una serie de hélices cortas y pequeños bucles, que contiene su secuencia, teniendo un palíndrome imperfecto. En estructuras de varillas algunos dominios pueden ser definidos, muchos viroides contienen una región central conservada (CCR) la cual esta localizada en el centro de la varilla y esta conformada por dos nucleótidos conservados estrechos, además de la estructura de varilla estos tienden a formar otras estructuras, las cuales pueden ser favorables en su equilibrio termodinámico, o atrapado cinéticamente en un estado metaestable. Algunos elementos de la estructura presentan estructuras estables o metaestables relacionadas con sus funciones biológicas.

El mecanismo de replicación de los viroides, puede ser por caminos asimétricos o simétricos. Diferentes enzimas están involucradas en los distintos tipos del ciclo de replicación, en cada caso la replicación incluye un paso dentro del proceso de oligómeros de replicación intermedia de una unidad de longitud de la molécula. Este paso es procesado por una molécula interna del viroide llamada ribosima o por proteínasas (RNasa) del hospedero.

La replicación es una etapa fundamental y necesaria para el ciclo infectivo de los viroides. A partir de mínimas cantidades de inóculo, los viroides son capaces de invadir tejidos distantes de la planta y acumularse en cantidades detectables. Este hecho conlleva que el viroide se multiplica de forma autónoma dentro del huésped al que infecta. Experimentos de fraccionamiento de células mediante centrifugación, hibridaciones *in-situ* y microscopía electrónica han mostrado que los viroides de la familia Pospiviroidae se acumulan en el núcleo (Diener 1979, Serra 2009). La molécula viroidal en este orgánulo se encuentra de diferentes formas, siendo la más abundante la unidad monomérica de una determinada polaridad a la que arbitrariamente se le ha denominado polaridad positiva. También se encuentran, aunque en menor cantidad, oligómeros de polaridad negativa. Estudios recientes apuntan a que ambos tipos de moléculas se localizan en el nucleoplasma pero las de polaridad positiva se acumulan en mayor medida en el nucleolo (Serra, 2009).

Para que se lleve a cabo la replicación de los viroides, se sigue el modelo llamado de círculo rodante (Fig. 1). Este modelo ha sido propuesto debido a la naturaleza circular del viroide y a la falta de intermediarios de ADN homólogos o complementarios a su secuencia. En este mecanismo solo intervienen intermediarios de ARN y se sustenta por la presencia de moléculas de ambas polaridades que se acumulan a distintas concentraciones. Atendiendo a la familia de viroide que se trate, el mecanismo de replicación se da de distintas formas. Los viroides de la familia Pospiviroidae siguen la vía asimétrica. En esta variante, la molécula circular de polaridad positiva sirve de molde para la síntesis de oligómeros lineales de polaridad negativa que a su vez sirven de molde para la síntesis de oligómeros de polaridad positiva. Estas moléculas son procesadas a unidades monoméricas que por autoligación dan lugar a moléculas circulares de polaridad positiva que son el punto de partida del ciclo replicativo el cual requiere de tres actividades catalíticas que son; la síntesis de ARN (actividad ARN polimerasa), el corte del ARN a unidades monoméricas (actividad ARNasa) y la circularización del ARN, actividad ARN ligasa (Serra, 2009).

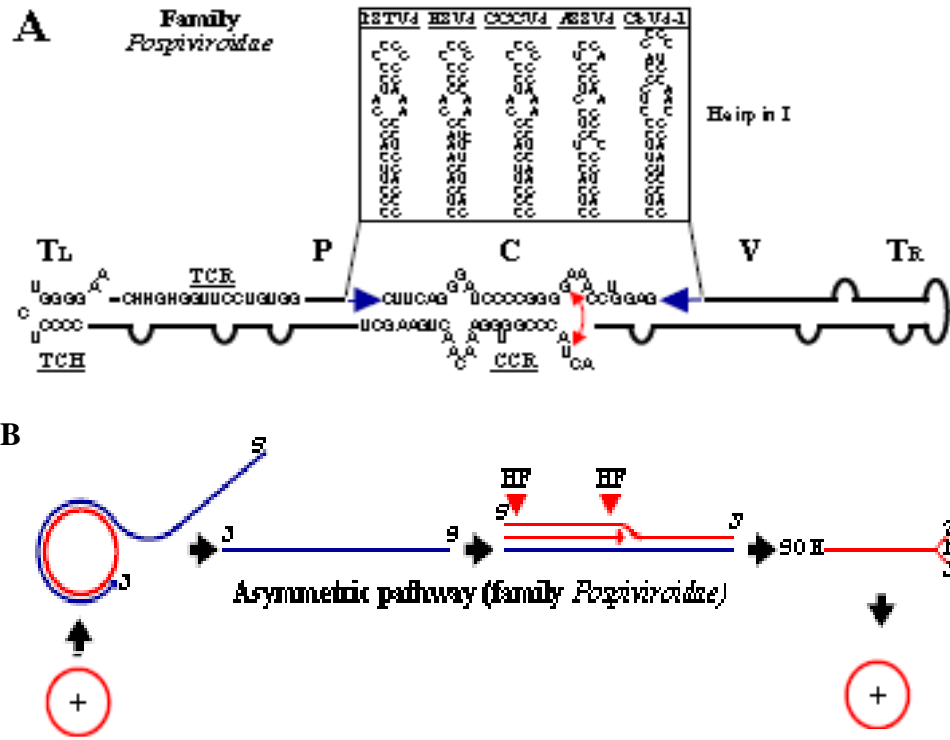


Figura 1. Replicación de viroides mediante círculo rodante (tomado de Verhoeven, 2010)

Los viroides tienen capacidad de infectar a las plantas de forma sistémica. En su ciclo infeccioso los viroides deben trasladarse al núcleo de la célula (familia Pospiviroidae), replicarse, salir al citoplasma, moverse a través de células, llegar e introducirse en el tejido vascular, moverse a través del floema y salir de este. Los viroides no codifican sus propias proteínas de movimiento ni requieren encapsidarse para moverse a lo largo de la planta. Sin embargo su genoma posee toda la información necesaria para interactuar directamente con factores del huésped aprovechando rutas y mecanismos endógenos de tráfico molecular para localizarse y completar todas sus funciones biológicas. Dada su simplicidad, los viroides son un buen sistema experimental para el estudio y comprensión de los mecanismos de tráfico intracelular, intercelular y sistémico del ARN (Ding y Itaya 2007; Flores *et al.*, 2005).

1.5. Enfermedades y expresión de síntomas

De las enfermedades ocasionadas por los viroides de los cítricos se encuentran aquellas que manifiestan síntomas de enanismos, agrietamientos, manchas y/o puntos necróticos en la corteza y peciolos de las hojas de las plantas de cítricos, enrollamientos de las hojas, hasta afectar el rendimiento de la planta. Con base en los viroides de los cítricos reciben estos su nombre como son la enfermedad de la exocortis causada por CEVd, teniendo como síntomas principales el enanismo, epinastia y distorsión de las hojas, estos tipos de síntomas pueden ser observados en un hospedero alternativo utilizado la planta indicadora *Gynura aurantiaca* (Verniere *et al.*, 2004 y Malfitano *et al.*, 2005).

Usualmente los viroides de los cítricos son diagnosticados mediante el uso de la planta indicadora cidra Etrog Arizona 861-S1 (*Citrus medica* L.), injertada sobre limón rugoso o Volkameriano (*Citrus volkamer* Ten y Pasq.) y cultivados con temperaturas controladas en invernadero. Los síntomas característicos de una infección por viroide incluyen el enanismo, epinastia y necrosis de la nervadura central en el peciolo y hojas. El tiempo que se toma para el desarrollo de los síntomas en cidra inoculada depende de la especie de viroide que contienen las plantas indexadas. Desde la fuente en el campo, usualmente las infecciones múltiples de viroides, expresión de los síntomas, puede ser influenciado por el sinergismo o las interacciones inhibitoras. En muchos casos una reacción positiva o negativa de la planta indicadora permite una evaluación precisa si el árbol se encuentra libre o no de viroides, pero esta prueba no indica la identificación de la especie de viroide (Serra *et al.*, 2008 y Barbosa, 2005).

La enfermedad de la cachexia de los cítricos está relacionada con el viroide HSVd del cual se conocen tres variantes, a, b y c, dependiendo del tipo de variante que se trate y del hospedero que infecte, los principales síntomas que puede causar a los cítricos son: el desquebrajamiento de la corteza en la unión del injerto y porta injerto, agrietamiento de ramas, afectando el área foliar de los árboles, tal sintomatología puede ser de severa a moderada dependiendo de la variante que se trate y del tipo de hospedero que esté infectando (Semansick *et al.*, 1988, Verniere *et al.*, 2004 y Malfitano *et al.*, 2005). A pesar que los agrietamientos fueron asociados inicialmente por aquellos

causados por la enfermedad de la cachexia, también pueden ser relacionados con la enfermedad del agrietamiento de la corteza de los cítricos ocasionada por CBCVd, dicha infección provocada por este agente causal en cidro Etrog produce enanismo y epinastia asociándose con la aparición de grietas en arboles injertados sobre *P. trifoliata* (Duran Vila *et al.*, 1988, Serra, 2009).

Otra enfermedad es aquella asociada con una necrosis de la nervadura central de las hojas, causada por el viroide CBLVd (sinónimo CVd-I), aunque este viroide no causa síntomas en plantas de cítricos de valor comercial, en la planta indicadora cidra Etrog provoca necrosis en las nervaduras centrales de la planta, por consiguiente una severa epinastia, que en ocasiones es acompañada por ciertos exudados gomosos en los tallos debido a la pérdida de una dominancia apical (Duran-Vila *et al.*, 1988, Serra, 2009).

Los enanismos en las plantas de los cítricos pueden deberse a varios factores y a una distinta gama de agentes causales, sin embargo dentro de las principales enfermedades está también puede ser causada por el CDVd (sinónimo CVd-III) teniendo como huésped experimental a la cidra Etrog, dentro del enanismo que causa CDVd en la planta indicadora también viene acompañado por un decamio de las hojas debido a la necrosis y anillamiento de los peciolos pudiendo ocasionar también epinastia. En especies comerciales provoca un enanismo general de la planta, sin embargo este síntoma para ciertos agricultores puede tener cierto interés, ya que al reducir el volumen de la copa de los árboles, puede facilitar las labores del cultivo (Vernière *et al.*, 2004, Bani Hashemian *et al.*, 2009 y Serra 2009).

1.6. Transmisión y epidemiología

Los viroides de los cítricos son fácilmente transmitidos y diseminados principalmente por propagación de plantas infectadas y que al ser utilizadas como porta injerto en cultivos comerciales. Otro medio de transmisión es por herramientas como tijeras para podar, implementos utilizados para las labores culturales de los árboles y que estos se encuentren contaminados con el agente causal, por lo tanto los viroides de los cítricos son transmitidos de manera mecánica. La eficiencia de la transmisión mecánica varía dependiendo del

hospedero donador y el receptor, así como la facilidad en la unión del floema. Hasta la actualidad no se ha demostrado que los viroides de los cítricos puedan ser transmitidos por algún agente vector o por semilla (Hadidi *et al.*, 2003 y Barbosa *et al.*, 2005).

La epidemiología de los viroides de los cítricos, así como de otros viroides que se conocen en la actualidad depende de algunos factores tales como el rango de plantas hospederas, el número de plantas infectadas además de su potencial de transmisión. Entre otros de los factores también se encuentran las plantas que sirven como hospederos alternos dentro de los cultivos de los cítricos, si existe suficiente fuente de inóculo dentro del cultivo éste puede ser fácilmente dispersado infectando plantas que probablemente se encuentren sanas (Verhoeven, 2010).

1.7. Regulación e impacto económico

Para evitar la entrada de enfermedades de cítricos en general, y de viroides en particular, países como Estados Unidos de América y México emplean programas de indexado biológico y pruebas de laboratorio para la detección de los viroides de los cítricos, teniendo como objetivo la producción de plantas de cítricos sanas y libre de enfermedades para que puedan ser utilizadas como injertos. Dicha regulación aplica programas de certificación con el uso de la cidra Etrog Arizona 861-S1 como planta indicadora y de la técnica de la transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección de viroides de los cítricos (Sieburth *et al.*, 2002, Almeyda *et al.*, 2003).

Otro criterio de regulación es el control de las importaciones de material vegetal que pueda ser una fuente de inóculo de viroides de los cítricos y que éste pueda ser utilizada como injerto de diferentes variedades de cítricos. El organismo nacional que regula la importación de productos vegetales es la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), mediante el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), implementaron Normas Oficiales Mexicanas (NOM's) para regular la importación de productos vegetales y prevenir la introducción de plagas y enfermedades, entre las cuales se citan las ocasionadas por viroides. Dentro del marco regulatorio de las normas oficiales que previenen la

introducción de enfermedades en los cítricos se encuentran la NOM-007-FITO-1995, NOM-011-FITO-1995 y NOM-079-FITO-2002 (Senasica, 2013).

El impacto económico que pueden tener los viroides de los cítricos en el campo de la citricultura es muy importante debido a los daños que este ocasiona, afectando el rendimiento y la calidad del fruto, al dañar los tejidos del floema de la planta y por consiguiente provocar agrientamientos en la corteza de los arboles, la epinastia, enanismos, clorosis y necrosis, afectando la capacidad productiva que tienen los árboles de cítricos, además de su valor nutrimental ya que son ricos en vitamina C y aceites esenciales, al ser utilizados para el consumo en fresco, como medicamentos, esencias, jugos, frutas frescas y otros, reduciendo la actividad económica de una región.

1.8. Bibliografía

1. Almeyda L. I. H., Iracheta C. M. M., Orona C. F., Kahlke C. J. y Rocha P. M. A. 2003. Extracción simple de ácidos nucleicos para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 364-369.
2. Bani Hashemian S. M., Serra P., Barbosa C. J., Juarez J., Aleza p., Corvera J. M. and Lluch A. 2009. Effect of a field-source mixture of citrus viroids on the performance of ‘nules’ clementine and ‘navelina’ sweet orange trees grafted on carrizo citrange. *Plant Disease* 93: 699-707.
3. Barbosa, C.J., Pina J. A., Pérez-Panadés J., Bernad L., Serra P., Navarro L., and Duran-Vila N. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89: 749-754.
4. Diener, T.O. 1979. *Viroids and Viroid Diseases*. Editorial Wiley-Interscience. pp: 25-50.
5. Ding B. and Itaya A. 2007. Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA Biology. *Mol. Plant Microbe Interactions* 20:7–20.
6. Duran-Vila N., Pina J. A., Ballester J. F., Juarez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante R. and Semancik J. S. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. L. W. Timmer, S. M. Garnsey and L. Navarro (eds.). 10th IOCV Conference. pp: 152-164

7. Flores R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C. R. Acad. Sci. III* 324: 943-952.
8. Flores R., Delgado S., Gas M. E., Carbonell A., Molina D., Gago S. and De la Peña M. 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier.* 567: 42-48
9. Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba E., Daròs J. A., and Di Serio F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 117–139.
10. Hadidi A., Flores R., Randles J. W. and Semancik J. S. 2003. Viroids. Editorial Science Publisher, Inc. pp 178-194.
11. Malfitano, M., Barone, M., Duran-Vila, N., and Alioto, D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 87: 115-121.
12. Semansik J. S., Roistacher C. N., Bustamante R. and Duran-Vila N. 1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. *Journal of the General Virology* 69: 3059-3068.
13. Senasica <http://www.senasica.gob.mx/?id=962> (15 de Mayo de 2014)
14. Serra P., Erias, M., Bani-Hashemian, Murcia N., Kitajima E.W., Daros J.A., Flores, R., and Duran-Vila, N. 2008. Citrus viroid V: Occurrence, host range, diagnosis and identification of new variants. *Journal of Phytopathology* 98: 1199-1204.
15. Serra A. P. 2009. Estudios de patogenicidad de viroides del género Apscaviroid y Hostuviroid en cítricos. Tesis Doctoral. Universidad Politecnica de Valencia. 157 p.
16. Sieburth P. J., Irely M., Garnsey S. M. and Owens R. A. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. N. Duran-Vila, R. G. Milne and J. V. da Graça (eds.). 15th IOCV Conference. pp: 230-239
17. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Graham, J.H. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. Segunda edición. The American Phytopathological Society. pp. 51-55.
18. Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A. and Botella L. 2004. Citrus viroids: symptoms expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Disease* 88:1189-1197.
19. Verhoeven J. Th. J. 2010. Identification and epidemiology of pospoviroids. Thesis. Wageningen University, Wageningen, NL. 136 p.

CAPÍTULO 2

Detección de viroides de los cítricos por electroforesis secuencial

2.1. Resumen

Debido a la naturaleza de los viroides, solamente han podido ser estudiados mediante bioensayos y técnicas de biología molecular. La utilización de plantas indicadoras en conjunto con la electroforesis secuencial (sPAGE), han sido de gran utilidad para la detección e identificación de moléculas de ARN patogénicas, y debido a su movilidad en un gel de poliacrilamida desnaturizante podemos diferenciar partículas de diferentes tallas moleculares y determinar si estas pertenecen a un patógeno particular. En el presente trabajo se estandarizó la técnica de sPAGE para la detección de dos viroides de los cítricos, utilizando un gel nativo de poliacrilamida al 5% y un gel desnaturizante con urea 8 M teñido este último con nitrato de plata. Se utilizaron como referencia controles positivos a los viroides CEVd y HSVd procedentes de cidra etrog, posteriormente se colectaron muestras de cítricos de una huerta en el estado de Nuevo León que habían sido reconocidas como positivas a viroides. Todas las muestras fueron analizadas por sPAGE. El protocolo de sPAGE fue efectivo para la detección de los dos viroides de cítricos mencionados a partir de controles positivos provenientes de cidra etrog, sin embargo no se detectaron muestras de campo positivas.

Palabras clave: sPAGE, CEVd, HSVd, CDVd.

2.2. Summary

By the nature of viroids, it only can be studied through bioassays and molecular biology techniques. The use of bioassays in conjunction with the sequential electrophoresis (sPAGE), has been useful for the detection and identification of pathogenic RNA and due to their mobility particles through denaturing polyacrylamide gels, we can distinguish between different molecular sizes and to determine whether these belong to a specific pathogen. In the present work, we standardized the sPAGE technique for detecting two citrus viroids, using a native polyacrylamide gel (PAGE 5%) and a denaturing gel with urea

8 M stained with silver nitrate. As a reference we used positive controls to CEVd and HSVd from etrog citron. Subsequently we collected citrus field samples from a grove in the province of Nuevo León that we know that there were positive to viroids. We obtained a sPAGE protocol for detecting citrus viroids from etrog citron but we can not detecting viroids from field samples.

Keywords: sPAGE, CEVd, HSVd, CDVd.

2.3. Introducción

México se ha distinguido por su producción de diferentes especies de cítricos como son: limón persa, limón mexicano, toronja, mandarina y naranja dulce, siendo uno de los principales exportadores a nivel mundial, lo cual ha representado grandes ganancias para el país (USDA, 2012).

Desde los años 70's se identificaron los viroides de los cítricos, comenzando con el *Viroide de la exocortis de los cítricos* (CEVd) y el *Viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd). En el año de 1988 fue descubierto el *Viroide del enanismo de los cítricos*, CDVd sinónimo (sin.) de CVD-III, *Viroide de la hoja doblada de los cítricos* (CBLVd, sin. CVd-I) y el *Viroide de la corteza agrietada de los cítricos* (CBCVd, sin. CVd-IV). Mas recientemente fue descrito el *Viroide V de los cítricos* (CVD-V) (Diener, 1979, Duran Vila *et al.*, 1988, Timmer *et al.*, 2000, Barbosa *et al.* 2005, Serra *et al.*, 2008). Por sus propiedades físicas y biológicas los viroides han sido ubicados dentro de la familia Pospiviroidae, siendo partículas de ARN monocatenario cerrada covalentemente, sin capacidad codificante, de polaridad positiva con replicación autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células que parasitan. El tamaño de los viroides es de alrededor de 246 a 402 nt, en forma de varilla. En general, los síntomas que ocasionan los viroides en la planta indicadora Cidra Etrog 861-S1 (*C. medica* L.) son enanismos, agrietamientos en la corteza, daños en las nervaduras de las hojas, peciolo, picado de la corteza, entre otros (Vidalakis *et al.* 2004, Wang *et al.*, 2009, Bagherian y Izadpanah, 2010).

Aunque actualmente solo se conocen los síntomas en la planta indicadora Cidra Etrog 861-S1, ciertos viroides no causan sintomatología en especies de importancia económica como son naranja dulce, limón, mandarino o toronja. Sin embargo el CDVd puede interactuar de manera sinérgica con otros viroides como CEVd y HSVd, provocando síntomas que pueden afectar la vida útil de una especie de cítricos susceptibles a estos (Malfitano *et al.*, 2005, Verniere *et al.*, 2006, Mohamed *et al.*, 2009). Por lo tanto el control de las enfermedades de los viroides de los cítricos es de manera preventiva, utilizando variedades certificadas, libre de enfermedades y evitar la transmisión mecánica (Serra *et al.*, 2008 y Barbosa *et al.* 2005).

El diagnóstico de enfermedades mediante la utilización de plantas indicadoras como la cidra etrog 861-S1 (*C. medica* L.) y *Gynura aurantiaca* al observar la expresión de los síntomas al ser inoculadas con una planta que se encuentra probablemente infectada con viroides, no permiten identificar la especie de viroide, sin embargo estos hospederos sirven como amplificador incrementando la concentración de viroides con lo cual se logra un mejor diagnóstico por medio de otras técnicas. Debido a lo anterior, la utilización de las técnicas de biología molecular como la sPAGE, hibridación de ácidos nucleicos y la RT-PCR son alternativas biológicas para la detección e identificación de las especies de viroides de los cítricos (Almeyda *et al.*, 2002, Ito *et al.*, 2002, Almeyda *et al.*, 2005, Bernard y Duran-Vila, 2005, Wang *et al.*, 2009).

La técnica sPAGE ha sido de gran utilidad en el descubrimiento de los viroides gracias a las propiedades físicas y biológicas que estos contienen en la migración en geles de poliacrilamida, ya que al ser de cadena cerrada unida covalentemente y su genoma de tamaño corto les permite emigrar diferencialmente a través de los geles de poliacrilamida. La sPAGE, es una alternativa para la detección de los viroides de los cítricos, diferenciándolos por el tamaño de sus moléculas, esta técnica utiliza dos tipos de geles de poliacrilamida, un gel nativo al 5% y un gel desnaturizante con un ingrediente adicional como la Urea 8 M, y las moléculas de ARN de viroides pueden ser visualizadas al ser teñidos los geles con nitrato de plata (Duran-Vila *et al.*, 1988, Alvarado *et al.*, 2000;

Verniere *et al.*, 2004, Bani Hashemian *et al.*, 2009, Murcia *et al.*, 2009, Önelge, 2010 y Sofy *et al.*, 2012).

Debido a los problemas que causan los viroides en los cítricos reduciendo su producción, además de la escasa información que existe sobre la ocurrencia de viroides en México, es necesario realizar un estudio en plantaciones cítricas en el noreste de México para tener una percepción más precisa de la situación fitosanitaria actual en esa zona cítrica, por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue implementar el método de electroforesis secuencial (sPAGE) para la detección de viroides de los cítricos, y aplicar la técnica con algunas muestras de la región.

2.4. Materiales y Métodos

Se realizó la extracción de ácido ribnucleico (ARN) de 3 controles positivos y 10 muestras de campo mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR}. Los controles positivos fueron proporcionados por la empresa Biociencia, S.A. los cuales habían sido mantenidos en cidra etrog 861-S1. Las muestras de campo fueron colectadas de árboles adultos en una huerta del municipio de General Terán, N.L. Se pesaron entre 500 mg a 1 g de tejido seco; para los controles positivos se utilizaron tubos de 1.5 ml y para las muestras de campo fueron utilizados tubos de 15 ml. Se homogenizó la muestra con el reactivo trizol, fue incubado durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugo a 12 000 x g durante 10 min, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo adicionando entre 500 a 1000 µl de 1-bromo-3-cloropropano, se homogenizó la mezcla y se dejó incubando durante 5 min a temperatura ambiente, fue centrifugado a 12 000 x g durante 10 min, se transfirió nuevamente el sobrenadante a un tubo nuevo adicionando entre 500 a 1000 µl de isopropanol, y fue centrifugado a 8 000 x g durante 7 min, posteriormente se adicionó 1 ml de Etanol al 70 %, y después fue centrifugado a 5 000 x g por 5 min y se recuperó el ARN en 100 a 200 µl con agua tratada con DEPC 1%.

Se estandarizó el método de sPAGE con controles positivos a los viroides de los cítricos, siguiendo el procedimiento descrito por Duran-Vila (1988) y Murcia *et al.* (2009) modificado, elaborando un gel de poliacrilamida nativo al 5 % (TAE 10 X, acrilamida 30

%, TEMED, persulfato de amonio 10 %). Se cargaron 10 µl del ARN en cada carril del gel y se aplicaron 100 V durante 2 hr. Posteriormente se tiñieron los geles con una solución de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV. Al término del corrimiento, se cortó el gel a una distancia entre los 100 y 400 pb. Posteriormente se preparó un gel de poliacrilamida al 5 % con Urea 8 M (Urea 8 M, TBE 5 X, TEMED y persulfato de amonio 10 %), y fue acoplado el trozo del gel nativo en el gel desnaturalizante; se aplicó un voltaje de 100 V durante 4 hr a temperatura ambiente, posteriormente se trató el gel en una solución fijadora a base de etanol al 10 % y ácido acético al 0.5 %, después con una solución de nitrato de plata 0.2 %, y se visualizó aplicando una solución reveladora con NaOH 3 % y formaldehído 0.5 %. Finalmente se colocó el gel en una lámpara con luz blanca, para observar los resultados.

2.5. Resultados y Discusión

La implementación de la técnica de electroforesis secuencial modificada descrita por Duran-Vila *et al.* (1988), Alvarado *et al.* (2000) y Murcia *et al.* (2009) fue satisfactoria para la detección de viroides de los cítricos. Al utilizar el ARN extraído a partir de controles positivos con el método comercial Trizol Reagent^{MR} y ser colocado en el primer gel, no se observaron partículas de ARN que indicaran la presencia de viroides al ser teñidos con bromuro de etidio, tal como reportó Murcia *et al.* (2009) al observar partículas de CEVd en la PAGE nativo, sin embargo al no utilizar un amplificador biológico como lo es la cidra Etrog es más difícil detectar moléculas de viroides ya que estos se pueden encontrar en concentraciones muy bajas en otras especies de cítricos, al correr el segundo gel (con urea al 8M) si fue posible visualizar las partículas de viroides CEVd y HSVd al ser teñido con nitrato de plata tal como lo describieron Duran-Vila *et al.* (1988), Alvarado *et al.* (2000) y Murcia *et al.* (2009) (Figura 1).

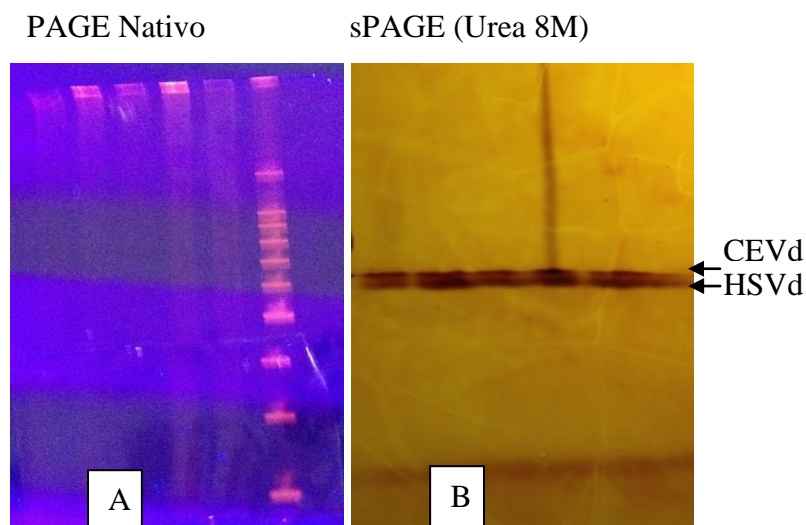


Figura 1. Electroforesis secuencial para viroides de los cítricos. (A) PAGE nativo teñido con bromuro de etidio, (B) gel desnaturalizante (urea 8M), teñido con nitrato de plata

Al utilizar la sPAGE en muestras de campo positivas a viroides, no fue posible detectar viroides (datos no mostrados), esto pueda deberse a la baja concentración de los mismos en las muestras de campo, por lo que se recomienda utilizar la cidra etrog para incrementar la concentración de los viroides como lo describe Duran-Vila *et al.* (1988) y Murcia *et al.* (2009).

2.6. Conclusiones

Se obtuvo un protocolo para la realización de electroforesis secuencial para la detección de viroides en cítricos a partir de muestras de cidra etrog.

Los viroides detectados por la sPAGE en controles positivos fueron CEVd y HSVd.

No se pudieron detectar viroides en muestras de campo de cítricos.

2.7. Bibliografía

1. Almeyda L., I. H., Iracheta C., M. M., Jasso A., J., Curti D., S. A., Ruiz B., P. and Rocha P., M. A. 2002. Re-examination of citrus viroids in Tahiti lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 152-160.
2. Almeyda L., I. H., Rocha P., M. A., Iracheta C., M. M., Orona C., F. y Kahlke C., J. 2005. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia*. 41: 87-93.

3. Alvarado-Gómez, O.G., J.P. Martínez-Soriano, B. Pereyra-Alfárez y M.A. Rocha-Peña. 2000. Comparación de métodos de extracción de RNA para la detección del viroide exocortis de los cítricos por electroforesis secuencial. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18:42-49.
4. Bagherian S., S. A. and Izadpanah K. 2010. Two novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. 21st International Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops. pp. 105-113.
5. Bani Hashemian, S. M., Serra P., Barbosa C., J., Juárez J., Aleza, Corvera J., M. and Lluch, A. 2009. Effect of a field-source mixture of citrus viroids on the performance of 'nules' clementine and 'navelina' sweet orange trees grafted on carrizo citrange. *Plant Disease*. 93: 699-707.
6. Barbosa, C.J. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89: 749-754.
7. Bernard, L. and Duran-Vila, N. 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. Sixteenth IOCV Conference. pp 452-455.
8. Diener, T.O. 1979. *Viroids and Viroid Diseases*. Editorial Wiley-Interscience. pp 25-50.
9. Duran-Vila, N., Pina J., A., Ballester J., F., Juárez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante, R. and Semancik, J. S. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. Edited by L. W. Timmer S. M. Garnsey L. Navarro. Tenth OICV Conference. pp: 152-164
10. Ito T., Ieki H., Ozaki K., Iwanami T., Nakahara K., Hataya T., Ito T., Isaka M. and Kano T. 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*. 92: 542-547.
11. Malfitano, M., Barone, M., Duran-Vila, N., and Alioto, D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology*. 87: 115-121.
12. Mohamed, M.E., Bani Hashemian, S.M., Dafalla, G., Bove, J.M., and Duran-Vila N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *Journal of Plant Pathology* 91: 185-190.
13. Murcia N., Serra P. Olmos A. and Duran-Vila N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*. 23: 95-102

14. Önelge N. 2010. Citrus Viroids in Turkey. Edited by: M. E. Hilf L. W. Timmer ·R. G. Milne J. V. da Graça. Proceedings, 17th Conference IOCV. pp: 225-226
15. Serra, P., Erias, M., Bani-Hashemian, Murcia N., Kitajima E.W., Daros J.A., Flores, R., and Duran-Vila, N. 2008. Citrus viroid V: Occurrence, host range, diagnosis and identification of new variants. *Journal of Phytopathology* 98: 1199-1204.
16. Sofy A. R., Soliman A. M., Mousa A. A. and El-DougDoug Kh. A. 2012. Molecular characterization and bioinformatics analysis of viroid isolate associated with citrus gummy bark disease in Egypt. *International Journal of Virology* 8: 133-150.
17. Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Graham, J.H. 2000. Compendium of Citrus Diseases. Segunda edición. The American Phytopathological Society. pp. 51-55.
18. Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A. and Botella L. 2004. Citrus viroids: symptoms expression and effect on vegetative growth and yield of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Plant Disease* 88: 1189-1197.
19. Vernière C., Perrier X., Dubois C., Dubois A., Botella L., Chabrier C., Bové J. M. and Duran Vila N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology* 96: 356-368.
20. Vidalakis G., Gumpf D. J., Bash J. A. and Semancik J. S. 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
21. Wang, X., Zhou C., Tang K., Zhou Y. and Li K. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Plant Pathology* 124: 175-180.
22. USDA <http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/citruswm/citruswm-07-26-2012.pdf> (Consultado el 23 de Agosto de 2012).

CAPÍTULO 3

Detección por RT-PCR Punto Final y Tiempo Real de Tres Especies de Viroides en Cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México

RESUMEN

Se desarrollaron tres protocolos de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green y se compararon con el método convencional RT-PCR punto final para la detección del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) y el viroide del enanismo de los cítricos (CDVd) tras evaluar distintas combinaciones de iniciadores específicos; adicionalmente se realizó el análisis para los tres viroides referidos en 90 muestras de cítricos colectadas en huertas del noreste de México. Las muestras evaluadas comprendieron diferentes especies colectadas en los municipios de General Terán, Montemorelos y Marín, en Nuevo León, además de Rio Bravo, Cd. Victoria e Hidalgo, en Tamaulipas. Se extrajo el ARN total de las muestras, y fueron analizadas mediante las técnicas de RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. Se detectó la presencia individual y conjunta de los viroides CEVd, HSVd y CDVd en las muestras analizadas. Usando la técnica de RT-PCR tiempo real con SYBR Green, se obtuvo un 41 % de muestras positivas a CEVd, 42 % a HSVd y 49 % al CDVd. Al comparar las técnicas de RT-PCR punto final y tiempo real, se obtuvieron resultados similares.

Palabras clave: RT-PCR, RT-PCR tiempo real, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

SUMMARY

Three protocols were developed based on real-time RT-PCR with SYBR Green system and were compared with conventional RT-PCR for detection of the Citrus exocortis viroid (CEVd), Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus dwarf viroid (CDVd) using specific primers combinations; additionally, we conducted the analysis of citrus viroids from 90 citrus threes samples collected in orchards in the northeast of Mexico. Evaluated citrus samples comprised different species from the municipalities of General Teran, Montemorelos and Marin, Nuevo Leon, besides Rio Bravo, Victoria city and Hidalgo, Tamaulipas. Total RNA

was extracted from the samples and analyzed by the techniques of multiple RT-PCR and real time RT-PCR with the SYBR Green system. We detected CEVd, HSVd and CDVd viroids individually and jointly in the samples. Using real-time RT-PCR with SYBR Green, we found a 41% of CEVd positive samples, 42 % for HSVd and 49 % to CDVd. Comparing endpoint multiplex RT-PCR with real-time RT-PCR techniques, minimal differences were obtained in the results.

Keywords: RT-PCR, real-time RT-PCR, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

3.3. INTRODUCCIÓN

México se ha distinguido por su producción de limón persa, limón mexicano, naranja dulce, toronja, mandarina y otras especies de cítricos, y es de los principales países exportadores a nivel mundial (USDA, 2012).

En los años 1972 y 1977 se identificaron los agentes causales de las enfermedades exocortis (CEVd) y cachexia de los cítricos (HSVd), respectivamente (Diener, 1979). Posteriormente, en 1988 se identificó el viroide del enanismo de los cítricos, CDVd (Duran-Vila *et al.*, 1988). Los viroides de cítricos se encuentran distribuidos en distintas partes del mundo, tales como: la región del Mediterráneo, Australia, Norte y Sur de África, Europa, Asia, además del Norte, Centro y Sur del Continente Americano (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.*, 2003; Önelge, 2010).

Los viroides de los cítricos pertenecen a la familia *Pospiviroidae*. Están constituidos por moléculas de ARN monocatenario cerradas covalentemente sin capacidad codificante, y capaces de replicarse de forma autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células que parasitan. El tamaño de su genoma es de alrededor de 246-402 nt; presentan forma de varilla o ramificada y ocasionan diferentes síntomas de acuerdo con las combinaciones entre especies de viroides y hospederos, pudiendo existir incluso sinergismo entre viroides, cuando ocurren de manera simultánea en más de una especie. Pueden provocar agrietamientos y escamas en la corteza, enanismo, epinastia, entre otros daños, en especies susceptibles (Flores, 2001; Vidalakis *et al.*, 2004; Bernard y Duran-Vila, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Bagherian y Izadpanah, 2010).

Habitualmente los viroides de los cítricos se diagnostican mediante bioensayos en la planta indicadora cidra Etrog Arizona 861-S1 (*Citrus medica* L.) injertada sobre limón rugoso (*C. jambhiri* Lush) y Volkameriano (*C. volkamer* Ten y Pasq.) pudiendo observarse la expresión de los síntomas de 3 a 6 meses después de su inoculación (Palacio *et al.*, 1999). Sin embargo, estos síntomas no permiten identificar la especie del viroide. El análisis de ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares constituyen una alternativa a los bioensayos para la detección e identificación de las especies de los viroides de los cítricos (Malfitano *et al.*, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2009). Algunos trabajos han demostrado el potencial de la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (RT-PCR) para la detección individual de viroides, y la RT-PCR múltiple para la detección simultánea de varios viroides (Ito *et al.*, 2002; Bernard y Duran-Vila, 2005; Wang *et al.*, 2009). En México hay pocos trabajos sobre la detección de viroides de cítricos por RT-PCR (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002 y 2005). En años recientes se han puesto a punto técnicas de detección de patógenos y moléculas mas sensibles y rápidas, como la RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green y sondas TaqMan, la cual intercala una molécula fluorescente en la doble cadena de ADN produciendo una señal que revela, con la ventaja de la amplificación exponencial en cada ciclo térmico. Gracias a su potencial la RT-PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección del viroide del tubérculo fusiforme de la papa, además de viroides de cítricos como el CEVd, HSVd y CDVd (Tessitori *et al.*, 2005; Rizza *et al.*, 2009).

Debido a los problemas que causan los viroides en los cítricos, además de la escasa información que existe sobre su incidencia en México, es necesario realizar estudios en plantaciones citrícolas en la región noreste para tener una percepción más precisa de la situación fitosanitaria actual. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue implementar el método de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green y compararlo con el método de RT-PCR punto final al determinar la incidencia de tres viroides de los cítricos en plantaciones comerciales de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Estandarización de RT-PCR tiempo real. Se estandarizó la técnica de RT-PCR tiempo real en un solo paso con el sistema iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR Green® (Bio-Rad), utilizando controles positivos de ARN total conteniendo a los viroides CEVd, HSVd y CDVd; los cuales fueron proporcionados por la empresa Biociencia S.A. Como controles negativos se utilizó ARN de plantas libres de viroides. Se evaluaron varias combinaciones de iniciadores específicos a cada uno de los viroides anteriores (Cuadro 1). Para cada uno de los ensayos se utilizó un programa térmico de acuerdo con las especificaciones del fabricante cambiando solamente la temperatura de anillamiento siendo de 56 °C para CEVd, y 58 °C para HSVd y CDVd. Además para comprobar que los iniciadores no formaran dímeros, a cada ensayo fue integrada una curva de disociación de 80 ciclos a una temperatura de 55-95 °C durante 1 min. con incrementos de 0.5 °C por cada ciclo.

3.4.2. Análisis de muestras de campo. Se procesaron 90 muestras colectadas en ocho huertas comerciales de cítricos, ubicadas en los municipios de Gral. Terán (Las Anacuas y Jorge Martínez), Montemorelos (Hacienda “El Mexiquito”) y Marín (Campo Experimental de la Facultad Agronomía de la UANL) del estado de Nuevo León; además se obtuvieron muestras del Campo Experimental del INIFAP y del huerto comercial “Real de Catorce” ubicados en los municipios de Río Bravo y Cd. Victoria, respectivamente; y de los predios “El Desengaño” y “Puente Azul”, en Hidalgo, Tamaulipas. Las especies de cítricos muestreadas fueron: naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), toronja (*C. paradisi* Macfad), limón (*C. limon* L.) y mandarina (*C. reticulata* Blanco). Se colectaron de manera aleatoria ramas y hojas de árboles adultos. Se realizó una extracción del ácido ribonucleico total (ARN) de las muestras mediante el método comercial Trizol® (Molecular Research Center), y se analizaron las muestras por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real en un solo paso. Los iniciadores utilizados en las reacciones de RT-PCR punto final se describen en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green para tres viroides de cítricos.

Tratamiento	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
1	CEVd-5 CEVd-F	acgagctcctgtttctcccgtg ggaacctggaggaagtcg	165	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Palacio <i>et al.</i> (1999)
2	CEVd-F CEVd-b	Ggaaacctggaggaagtcg gtttctccgctggagcg	83	Palacio <i>et al.</i> (1999) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
3	CEVd-7 CEVd-b	ccgggcgagggtgaaagccc gtttctccgctggagcg	169	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
4	CEVd-5 CEVd-7	acgagctcctgtttctcccgtg ccgggcgagggtgaaagccc	86	Sieburth <i>et al.</i> (2002)
5	HSVd-b CVdII-H1	Gtctcactcgaagagccag cgccccgggcaactcttctcagaatcc	138	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Palacio <i>et al.</i> (1999)
6	CCaVd-der CVdII-H1	cgcggcagaggctcagatag cgccccgggcaactcttctcagaatcc	202	Levy y Hadidi (1993) Palacio <i>et al.</i> (1999)
7	HSVd-b CV2-AP (+)	gtctcactcgaagagccag ggcaactcttctcagaatccagc	131	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Ito <i>et al.</i> (2002)
8	CCavd-der CV2-AP (+)	Cgcggcagaggctcagatag ggcaactcttctcagaatccagc	195	Levy y Hadidi (1993) Ito <i>et al.</i> (2002)
9	CVdIII-C CVdIII-F	Ttcgtcgacgacgacaggtg gtctccgctagtcggaaagactccg	85	Palacio <i>et al.</i> (1999) Sieburth <i>et al.</i> (2002)
10	CVdIII-F CVdIII-R	gtctccgctagtcggaaagactccg cgtcaccaacttagctgccttctgt	269	Sieburth <i>et al.</i> (2002)

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para el RT-PCR múltiple en un solo paso para tres viroides de cítricos.

Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del Producto (pb)	Referencia
CEV-R	ccggggatccctgaagga	371	Gross <i>et al.</i> (1982)
CEV-F	ggaaacctggaggaagtcg		
HSVd-R	ccggggctccttctcagtaagt	302	Sano <i>et al.</i> (1988)
HSVd-F	ggcaactcttctcagaatccagc		
CVd-III-R	cgtcaccaacttagctgccttcgt	269	Sieburth <i>et al.</i> (2002)
CVd-III-F	gtctccgctagtcggaaagactccg		

Las reacciones de RT-PCR múltiple punto final fueron llevadas a cabo en un volumen 25 μL de acuerdo con Wang *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Se utilizó el kit Super Script One step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum[®] (Invitrogen). En las mezclas de reacción se incorporaron los iniciadores a una concentración de 0.2 μM para CDVd, 0.5 μM para CEVd y 0.1 μM para HSVd (Cuadro 2). El protocolo consistió en mezclar 12.5 μL de amortiguador 2X, 6.75 μL de una mezcla de 6 iniciadores, 0.5 μL de enzima RT-*Taq* y de 150 a 200 ng de ARN (2 μL). Se completó el volumen total con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros térmicos de las reacciones, comienzan con una incubación a 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min y 35 ciclos con un paso de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, un anillamiento a 58 °C por 30 s, y una extensión a 68 °C por 45 s, además de una extensión final a 68 °C durante 7 min.

Los productos de la RT-PCR múltiple fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Las mismas muestras fueron procesadas mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green con el uso de iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd, y CDVd, seleccionados en la etapa anterior. Las reacciones fueron realizadas en una mezcla de 25 μ l con el kit iScript™ One Step RT-PCR SYBR Green® (Bio-Rad). La reacción fue formada con una concentración de iniciadores de 0.3 μ M. El protocolo utilizado de SYBR Green consistió en 12.5 μ L de amortiguador 2 X, 0.75 μ L de cada uno de los iniciadores, 0.5 μ L de enzima iScript RT, 2 μ L de ARN y se completó el volumen total a 25 μ L con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros de temperatura para HSVd y CDVd fueron los siguientes: 50 °C durante 10 min, 95 °C por 5 min, 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 95 °C por 10 s, anillamiento de 58 °C durante 30 s. Los parámetros de temperatura para CEVd fueron iguales que el anterior con la diferencia que la temperatura de anillamiento fue de 56 °C durante 30 s.

3.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Estandarización de RT-PCR tiempo real. Los resultados obtenidos con los iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd y CDVd utilizando los controles positivos fueron satisfactorios. En el caso de CEVd, el umbral de amplificación (Ct) fue rebasado a los 21, 22, 31 y 33 ciclos para las combinaciones de iniciadores (tratamientos) 1, 2, 3 y 4 respectivamente; para HSVd el umbral se rebasó a los 22, 24, 27 y 28 ciclos correspondiendo a los tratamientos 5, 7, 6 y 8; y para CDVd, los valores de Ct fueron 31 y 35 ciclos para los tratamientos 9 y 10 respectivamente (Figura 1). De las cuatro combinaciones de iniciadores utilizadas para CEVd y cuatro para HSVd, dos combinaciones para CEVd y dos para HSVd formaron dímeros de iniciadores de acuerdo con las curvas de disociación (datos no mostrados) lo cual en algunos casos ocasionó una amplificación inespecífica. En el caso de los 3 viroides los controles negativos no rebasaron los umbrales de fluorescencia. Para el análisis de las 90 muestras, se seleccionaron los pares de iniciadores que tuvieron el menor umbral de amplificación (Ct) para cada viroide sin formación de dímeros, en el caso de exocortis se seleccionó la combinación CEVd-5/CEVd-F (tratamiento 1) con un Ct de 21, para cachexia se escogió HSVd-b/CVdII-H1 (tratamiento 5) con un Ct de 22 y para CVd-III la combinación CVd-IIIC/CVd-IIIF (tratamiento 9) con un Ct de 31. La temperatura de anillamiento adecuada para CEVd fue

de 56 °C, y para HSVd y CDVd fue de 58 °C; dichas temperaturas funcionaron de manera adecuada para cada uno de los ensayos con los iniciadores seleccionados para cada viroide. Los resultados anteriores coinciden con los trabajos hechos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009), en la utilización del RT-PCR en tiempo real con SYBR Green como método de detección de viroides de los cítricos. Sin embargo una de las diferencias del presente estudio fue la utilización de un kit de RT-PCR en tiempo real en un solo paso a diferencia de los utilizados por los autores antes mencionados los cuales utilizaron kit en dos pasos. Por lo tanto, el protocolo aquí utilizado es más rápido y tienen menos probabilidad de contaminarse las muestras, además de que los iniciadores aquí utilizados fueron diferentes a los referidos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009). En este trabajo también se logró obtener un mismo programa térmico para los viroides HSVd y CDVd el cual pude ser utilizado en análisis simultáneos de ambos viroides reduciendo el tiempo de detección.

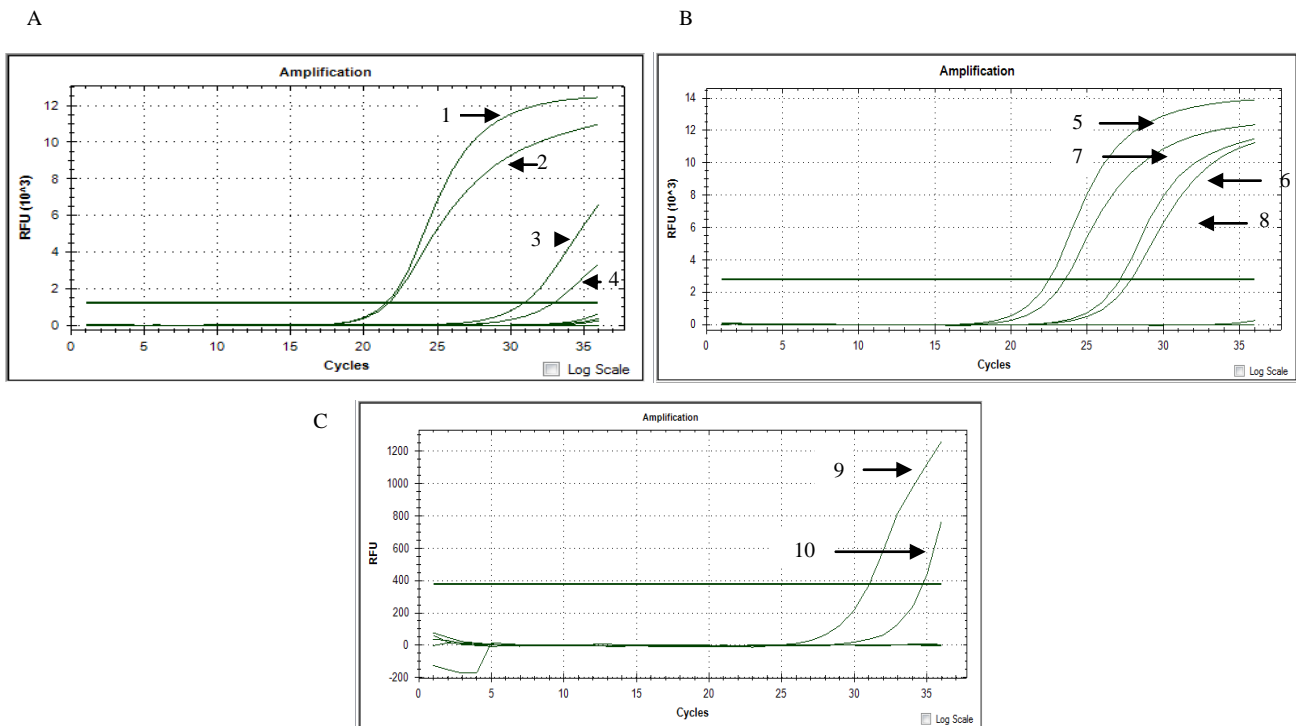


Figura 1. RT-PCR tiempo real con SYBR Green utilizando controles positivos y diferentes combinaciones de iniciadores. A. CEVd: 1. CEVd-5/CEVd-F; 2. CEVd-F/CEVd-b; 3. CEVd-7/CEVd-b; 4. CEVd-5/CEVd-7. B. HSVd: 5. HSVd/CVdII-H1; 6. CCaVd-

der/HSVdII-H1; 7. HSVd-b/CV2-AP(+) y 8. CCaVd-der/CV2-AP (+). C. CDVd: 9. CVdIII-C/CVdIII-F y 10. CVdIII-F/CVdIII-R.

3.5.2. Análisis de muestras de campo. Con respecto a las reacciones de RT-PCR múltiple punto final, de las 90 muestras de diferentes especies de cítricos colectadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, fue clara la detección de CEVd, pero no de HSVd ni de CDVd, ya que los productos obtenidos de las reacciones con los iniciadores utilizados, se empalmaron en el gel debido a que tienen una talla similar aunque si fue posible diferenciarlos. De las 90 muestras colectadas y analizadas, 37 resultaron positivas a CEVd, 38 a HSVd y 44 a CDVd utilizando la RT-PCR múltiple convencional (Cuadro 3), sin embargo al ser corroboradas mediante el sistema de RT-PCR con SYBR Green se observó una diferencia de una muestra para CEVd y una para CDVd, resultando 36 y 43 muestras positivas respectivamente (Figura 2). En el caso de HSVd, los resultados obtenidos fueron los mismos con ambos protocolos.

Cuadro 3. Incidencia de tres viroides en muestras de cítricos colectadas en varias localidades de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

Estado	Municipio	No. de muestras	Muestras positivas (No./%)		
			CEVd	HSVd	CDVd
Nuevo León	Gral. Terán	26	10/38.5	12/46.2	12/46.2
	Montemorelos	10	4/40	10/100	9/90
	Marín	19	2/10.5	0/0	2/10.5
Tamaulipas	Río Bravo	5	1/20	2/40	1/20
	Cd. Victoria	9	2/22.2	4/44.4	4/44.4
	Miguel Hidalgo	21	18/85.7	10/47.6	16/76.2
Total		90	37/41	38/42	44/49

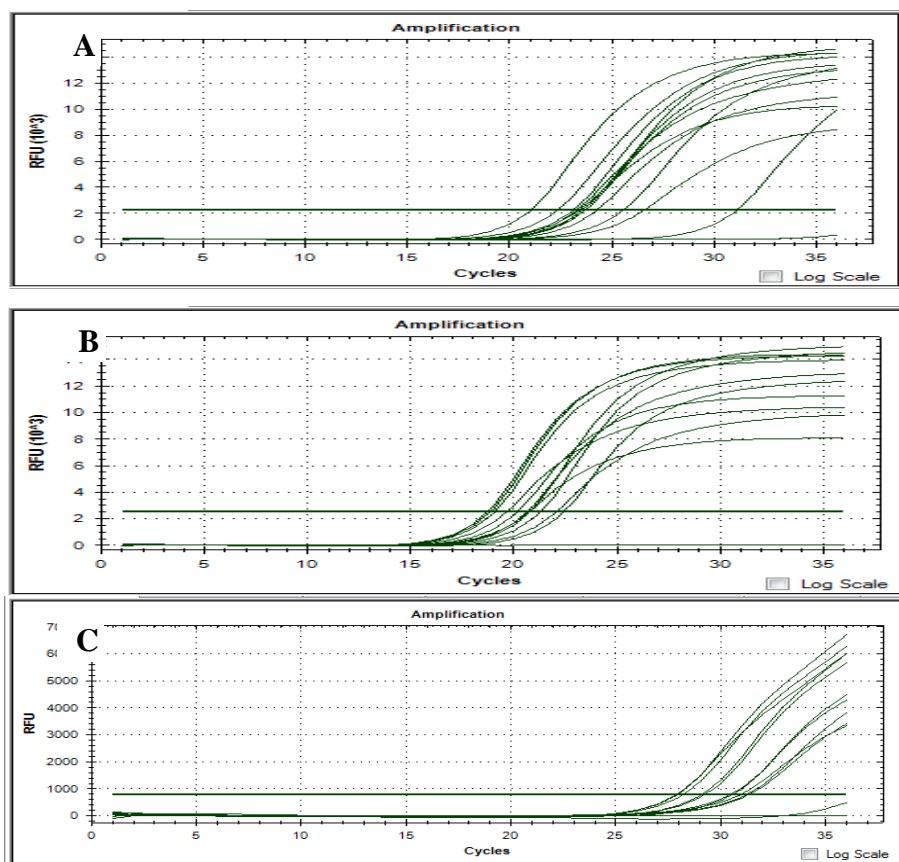


Figura 2. RT-PCR tiempo real con SYBR Green en muestras de cítricos de campo. A. CEVd. B. HSVd. C. CDVd. Cada curva sigmoide corresponde a una muestra de campo.

En general, el CDVd fue el viroide presente con mayor frecuencia y distribución en las regiones de estudio, lo cual puede explicarse por la falta de regulación en México para este viroide, sin embargo los viroides CEVd y HSVd también tuvieron una frecuencia alta en las muestras de estudio, a pesar de estar regulados por las Normas Oficiales Mexicanas.

3.6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green, rápido, específico y sensible para la detección de los viroides de cítricos CEVd, HSVd y CDVd. Las combinaciones de iniciadores CEVd-5/CEVd-F; HSVd-b/CVdII-H1 y CVdIII-C/CVdIII-F, dieron los mejores resultados para la detección de los viroides CEVd, HSVd y CDVd respectivamente, mediante RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. El

análisis de 90 muestras de cítricos por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con SYBR Green, tuvieron diferencias mínimas en la detección de los viroides variando sólo en dos muestras. En las localidades de estudio, los ensayos mostraron una mayor incidencia del CDVd con un 49 % del total de muestras analizadas, seguido de 42 % para HSVd y 41 % para CEVd.

3.7. BIBLIOGRAFÍA

- Almeyda LIH, Iracheta CMM, Jasso AJ, Curti DSA, Ruiz BP and Rocha PMA. 2002. Re-examination of citrus viroids in tahiti lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 152-160.
- Almeyda LIH, Rocha PMA, Iracheta CMM, Orona CF y Kahlke CJ. 2005. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia* 41: 87-93.
- Alvarado GOG, Rocha PMA, Silva VS, Martínez SJP, Lee RF, Rivera BR and Ruíz BP. 2000. Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México. Pp:289-293. *In: da Graca JV, Lee RF and Yokomi RK (eds.). Proceedings of the 14th IOCV Conference. Riverside, CA. 436p.*
- Bagherian SSA and Izadpanah K. 2010. Two novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. Pp:105-113. *In: 21st International Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops.*
- Bernard L and Duran Vila N. 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. Pp:452-455. *In: Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). Proceedings of the 16th IOCV Conference. Riverside, CA. 517p.*
- Diener TO. 1979. *Viroids and Viroid Diseases.* Editorial Wiley-Interscience. 245 p.
- Duran Vila N, Pina JA, Ballester JF, Juarez J, Roistacher CN, Rivera BR and Semancik JS. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *In: Pp152-164. Timmer LW, Garnsey SM and Navarro L (eds.). Proceedings of the 10th IOCV Conference. Riverside, CA. 428p.*
- Flores R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C. R. Acad. Sci. III* 324: 943-952.

- Gross HJ, Krupp G, Domdey H, Raba M, Jank P, Lossow C, Alberty H, Ramm K and Sanger HL. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroids. *European Journal Biochemistry* 121:249-257.
- Hadidi A, Flores R, Randles WJ and Semancik SJ. 2003. *Viroids*. CSIRO Publishing. 392p.
- Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, Ito T, Isaka M and Kano T. 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.
- Levy L and Hadidi A. 1993. Direct nucleotide sequencing of PCR amplified DNAs of the closely related citrus viroids Ila and I Ib (Cachexia). Pp. 180-186. *In: Moreno P, da Graça JV and Timmer LW (eds.)*. Proceedings 12th Conference IOCV, Riverside, CA. 471p.
- Malfitano M, Barone M, Duran Vila N and Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania, southern Italy. *Journal of Plant Pathology* 87: 115-121.
- Mohamed ME, Bani HSM, Dafalla G, Bove JM and Duran Vila N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *Journal of Plant Pathology* 91: 185-190.
- Önelge N. 2010. Citrus viroids in Turkey. Pp. 225-226. *In: Hilf ME, Timmer LW, Milne RG and da Graça JV (eds.)*. Proceedings of the 17th Conference IOCV, Riverside, CA. 275p.
- Palacio BA, Foissac X and Duran Vila D. 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *European Journal of Plant Pathology* 105: 897-903.
- Rizza S, Nobile G, Tessitori M, Catara A and Conte E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology* 58: 118-185.
- 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 Research* 16:347.
- Sieburth PJ, Irely M, Garnsey SM and Owens RA. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. Pp. 230-239. *In: Duran Vila N, Milne RG, and da Graça JV (eds.)*. Proceedings of the 15th IOCV Conference. Riverside, CA. 456p.
- Tessitori M, Rizza S, Reina A and Catara A. 2005. Real-Time RT-PCR based on SYBR-Green I for the detection of citrus exocortis and citrus cachexia diseases. Pp. 456-459.

- In:* Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). Proceedings of the 16th IOCV Conference. Riverside, CA. 517p.
- Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH. 2000. Compendium of Citrus Diseases. 2nd edition. The American Phytopathological Society. 88 p.
- USDA. 2012. CITRUS: World markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (consulta julio de 2012).
- Verniere C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C, Bové JM and Duran Vila N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology* 96: 356-368.
- Vidalakis G, Gumpf DJ, Bash JA and Semancik JS. 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
- Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y and Li K. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal Plant Pathology* 124: 175-180.

CAPÍTULO 4

Detección del viroide achaparramiento de los cítricos por qRT-PCR con sondas Taq Man en muestras de cítricos del noreste de México

4.1. Resumen

Se implementó un protocolo de RT-PCR en tiempo real con sondas Taq Man para la detección del viroide achaparramiento de los cítricos (CDVd), y se validó la técnica con 50 muestras de cítricos de 18 variedades procedentes de Marín, Nuevo León e Hidalgo, Tamaulipas, comparando los resultados obtenidos con RT-PCR convencional. Se utilizó corteza y hojas de árboles muestreados al azar a las cuales se les extrajo el ARN por el método del Trizol^{MR}, y se analizaron las muestras mediante las técnicas de qRT-PCR y RT-PCR convencional en un solo paso. Hubo una coincidencia absoluta en los resultados con ambas técnicas. De 19 muestras de cítricos del estado de Nuevo León, 8 resultaron positivas al CDVd (42 %), y del estado de Tamaulipas 11 muestras de 21 fueron positivas (52.4 %). Las especies de cítricos en donde fue detectado el CDVd fueron: mandarino, citrange carrizo y naranja valencia. La abundante ocurrencia del CDVd puede atribuirse a la propagación por injerto, y a que este viroide no está regulado y no forma parte de los programas de certificación fitosanitaria de cítricos en México.

Palabras Clave: CDVd, CVd-III, qRT-PCR

4.2. Summary

A protocol of qRT-PCR was implemented with Taq Man probes for detection of citrus dwarfing viroid (CDVd) and the technique was tested with 50 samples of 18 varieties of citrus from Marín, Nuevo León and Hidalgo, Tamaulipas. We used bark and leaves from adult trees sampled randomly. The RNA was isolated using the Trizol^{MR}, and we analysed the samples by qRT-PCR and one step RT-PCR. There was agreeing in the results with both methods. Of 19 citrus samples from Nuevo León, 8 samples were positive to CDVd (42 %) and 11 samples from 21 from Tamaulipas gave positive reaction (52.3 %). Citrus species where CDVd was detected were: mandarin, Carrizo citrange and Valencia orange. The presence of CDVd in Nuevo León and Tamaulipas can be attributed to propagation by

grafting and that this viroid is not regulated and is not part of phytosanitary certification program of citrus in Mexico.

Keywords: CDVd, CVd-III, qRT-PCR

4.3. Introducción

Los viroides son partículas pequeñas infecciosas que están constituidas por ARN de cadena sencilla, con polaridad positiva, miden alrededor de 246 a 401 nucleótidos y dependen de las enzimas del sistema de replicación de su hospedero para poder multiplicarse (Wang *et al.* 2009, Ito *et al.* 2002).

La familia de las rutáceas son un grupo de plantas cultivables importantes en México destacando aquellas pertenecientes al género *Citrus*, por su elevado consumo, ocupando nuestro país el primer lugar en producción de limón y el 5 lugar en otras especies como naranja, mandarina, toronja y pomelo (SIAP, 2010). El grupo III de viroides de cítricos fue descrito por Duran-Vila y colaboradores (Duran-Vila *et al.*, 1988) al cual se agregaron luego algunas propiedades características en la expresión de sus síntomas (Rakowski *et al.*, 1994).

El viroide del achaparramiento de los cítricos (CDVd, sinónimo CVd-III), es un miembro del genero Apscaviroid de la familia Pospiviroidae con una región central conservada (CCR) la cual es característica de los miembros de esta familia, con un tamaño aproximado de 280 a 292 nucleótidos (Rakowski *et al.*, 1994). El rango de hospederos está restringido a cítricos y los síntomas no están asociados específicamente con la infección en especies comerciales. En Cidra Etrog (*Citrus medica*) 861-S1 se indica que CDVd causa enanismo, decaimiento de la hojas y una epinastia moderada resultando una necrosis en el peciolo y la nervadura central de la hoja (Murcia, *et al.* 2009).

En varios estudios se han encontrado aislamientos del CDVd en Israel y Costa Rica mostrando síntomas de enanismo en *Citrus macrophylla* (Tessitori *et al.*, 2002), también se han obtenido aislados en cultivos de cítricos de naranja dulce en el estado de Florida en Estados Unidos de Norte América (Garnsey *et al.*, 2002).

La presencia del CDVd ha sido detectada en el Sur de África afectando naranjo trifoliado como portainjerto de naranjo dulce, y en Australia se observó enanismo asociados con viroides en cítricos. Síntomas similares en conjunto con picaduras gomosas fueron encontrados en cítricos en Italia y Turkia asociados con CDVd (Vuuren *et al.* 2005). Igual que otros viroides, CDVd muestra diferentes niveles de replicación en varias especies de cítricos y su título depende considerablemente del hospedero y de las condiciones ambientales en las cuales están presentes (Rizza *et al.* 2009).

En México hay muy pocos trabajos de investigación publicados sobre viroides de los cítricos, y menos aún sobre el CDVd. La información sobre la distribución del CDVd en México es escasa y sólo hay un solo reporte en árboles de un Banco de Germoplasma en el estado de Nuevo León en 4 variedades de naranja (Almeyda *et al.*, 2003).

Debido a lo anterior es necesario conocer la ocurrencia y distribución del CDVd en la región debido al daño potencial al actuar en conjunto con otros viroides como en el caso de la lima Tahiti o limón persa (*Citrus aurantifolia* Swingle). La técnica reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) tiene una gran sensibilidad para la detección de moléculas de ARN en sus modalidades convencional y tiempo real, y ambas pueden ser utilizadas en el diagnóstico de virus y viroides. Por lo anterior el objetivo del presente trabajo fue implementar un protocolo de qRT-PCR con sondas TaqMan para la detección del CDVd, y determinar la incidencia del mismo en distintas variedades de cítricos, en huertas de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, comparando el qRT-PCR y el RT-PCR convencional.

4.4. Materiales y Métodos

4.4.1 Muestreo

Se analizaron 49 muestras de cítricos de diferentes variedades y especies en las localidades de Marín, Nuevo León e Hidalgo, Tamaulipas, siendo los predios evaluados el de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León y dos lotes

comerciales: “El Desengaño” y “Puente Azul”, perteneciente al estado de Tamaulipas. Se colectaron muestras de corteza y hojas de 4 especies diferentes de cítricos. (Cuadro1).

Especie	Variedades muestreadas
<i>Citrus sinensis</i> L. (Naranja Dulce)	Cara Cara, Valencia Delta, Valencia criolla, Valencia olinda, Valencia old, Cambell california, Valencia
<i>C. reticulata</i> Blanco (Mandarina)	Fermon, Fairchild, Nova, Monica, Dancy, Ortanique
<i>C. paradisi</i> Macfad (Toronja)	Doble roja, Flame, Rio Red, March, Star Ruby
<i>C. latifolia</i> L. (Limón)	Limón Persa

Cuadro 1. Especies y variedades de cítricos muestreados en los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

4.4.2. Aislamiento del ARN total y reacciones de RT-PCR

Se extrajo el ácido ribonucleico total utilizando 100 mg de tejido de corteza y hojas de cítricos previamente cortadas en trozos, mediante la técnica de trizol reagent (Invitrogen^{MR}) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se realizaron las reacciones de RT-PCR punto final con oligonucleótidos específicos al CVd-III (Cuadro 2). Los controles positivos utilizados en el ensayo fueron proporcionados por la empresa Biociecia.

Nombre del Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño Producto (pb)	*Sitio de unión	Referencia
CVd-III-R CVd-III-F	cgtcaccaacttagctgccttcgt gtctccgctagtcggaaagactccg	269	91-112 135-159	Sieburth et al. (2002)
CVd-III-H CVd-III-C	ggcagctaagttggtgacgc ttcgtcgacgacgacaggtta	293	94-113 93-74	Palacio-Bielsa (1999)

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para RT-PCR punto final.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en una mezcla de 25µl con un kit Super Script one step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum^{MR} (Invitrogen). Las reacciones fueron formadas con una concentración de los iniciadores de 0.2 µM. El protocolo óptimo de one-step consistió de 12.5 µl de buffer 2 X, mezcla de iniciadores, 2.5 U de enzima RT-Taq, 2

µl de ARN y completar el volumen total (25 µl) con agua libre de nucleasas. Los parámetros de temperatura de la RT-PCR utilizado, comienza con una incubación inicial de 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización de la enzima de RT de 94 °C por 2 min y 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 94 °C durante 30s, un alineamiento del iniciador a 58 °C por 30 s, una extensión a 68 °C por 45 s y una extensión final de 68 °C durante 7 min. Los productos de la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Se aplicó la técnica de RT-PCR en tiempo real en dos pasos con el sistema TaqMan (Applied Biosystem^{MR}) para la detección de CDVd, con controles positivos al viroide. Se extrajo el ARN mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR}, y el ARN fue copiado a ADNc mediante la utilización del iniciador CVd III-R (cgtcaccaacttagctgccttctgt) (Sieburth *et al.* 2002), se tomaron 3 µl de ARN y fue calentado a 65 °C durante 5 min y se colocó en hielo, posteriormente se le adicionó, 2 µl buffer 5 X, 2 µl dNTP's 10 mM, 0.125 µl RNasin 1 U / µl, 0.5 µl M-MLV 1 U / µl, 1 µl del iniciador CVd III-R y se completó a 7.5 µl con agua estéril. Posteriormente se realizó la PCR en tiempo real con el sistema TaqMan adicionando lo siguiente: 1 µl de 20 X TaqMan Gene Expression Assay (Cuadro 1), 10 µl 2 X iQSupermix, 4 µl ADNc y se completó con agua estéril a 20 µl. El programa térmico utilizado para la RT-PCR tiempo real fue el siguiente: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, y 40 ciclos térmicos con una temperatura de 95 °C 15 seg y 60 °C 60 seg.

20 X TaqMan Gene Expression Assay	
AI0IW0G_F	GCCTCCGCTAGTCGGAAAG
AI0IW0G_R	ACTCAGTTGTCCGCTCGAC
AI0IW0G_M	FAM-3'ATCCTCCGGCAGACCC'5-NFQ

Cuadro 1. Contenido del 20 X TaqMan Gene Expression Assay Applied Biosystem^{MR} para la detección del CDVd

4.5. Resultados y Discusión

De los juegos de iniciadores utilizados en la RT-PCR, para la detección del CVd-III, resultaron satisfactorios los oligonucleótidos CVd-III-F y R como lo descrito por Wang *et al.* 2009.

Al analizar 49 muestras de cítricos procedentes de las huertas de la Facultad de Agronomía de la UANL, localizada en Marín, Nuevo León, y las huertas “El Desengaño” y “Puente Azul”, de Hidalgo, Tamaulipas, se obtuvieron resultados satisfactorios en la detección del viroide III con el kit de one-step RT-PCR super script III, las muestras que resultaron positivas fueron de la siguiente manera: de la huerta del estado de Nuevo León se obtuvieron 8 muestras positivas de 19, representando el 42 % del total de las muestras, las variedades que resultaron positivas a el viroide fueron aquellas correspondientes a naranjo dulce, naranjo delta valencia, naranjo criollo valencia, mandarina Mónica y Dancy. De las muestras colectadas en los huertos “El Desengaño” y “Puente Azul”, en Tamaulipas resultaron positivas 11 muestras de 21 correspondiendo el 52.3 % del total de variedades muestreadas, siendo la principal naranjo dulce de la variedad Valencia, además obteniendo resultados positivos de muestras donde presentaban la presencia de más de un viroide siendo estos: CEV, CVd-II y CVd-III (datos no mostrados) dichos resultados concuerdan con aquellos obtenidos por Wang et al. (2009), Rizza et al. (2009) y Murcia et al. (2009), en donde las variedades de naranjo dulce injertados sobre agrio son uno de los tipos de hospederos en donde se puede encontrar mas frecuentemente al CVd-III. El análisis también mostró que el CVd-III se puede encontrar en mandarina de las variedades Mónica y Dancy (Figura 1).

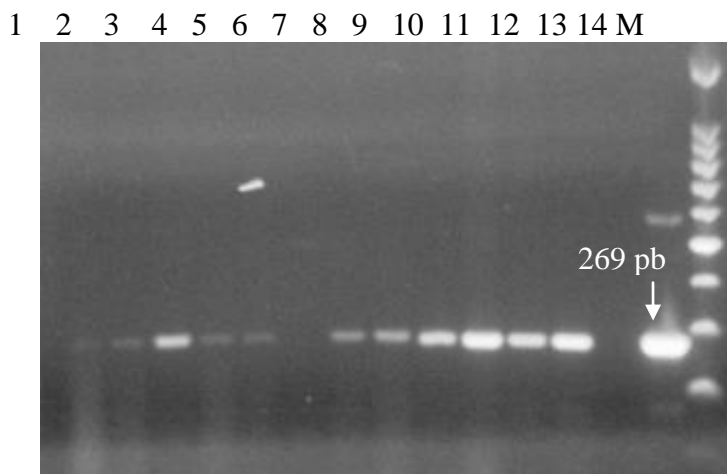


Figura 1. RT-PCR del CVd-III de muestras de Nuevo León y Tamaulipas. Carriles 1-5 = muestras cítricos Facultad de Agronomía, Municipio de Marín, N. L. Carriles 6-10 = muestras cítricos “El Desengaño”, Hidalgo, Tamaulipas. Carriles 11-12 = muestras cítricos “Puente Azul”, Hidalgo, Tamaulipas, M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Con los resultados obtenidos de la RT-PCR convencional nos podemos dar cuenta de la calidad fitosanitaria en la cual se encuentran 3 huertos comerciales de cítricos en el noreste de México.

Además se obtuvo que las variedades de naranjo dulce injertadas en naranjo agrio contuvieran al CVd-III, así como en dos variedades de mandarina. La distribución del CVd-III se determinó satisfactoriamente observando que el viroide se encuentra dispersado en los dos estados del noreste de México, obteniendo una mayor presencia en las huertas pertenecientes al estado de Tamaulipas, y aunque se detectó el CVd-III en la huerta de Nuevo León su detección fue escasa obteniendo resultados solamente en 8 muestras de cítricos.

De acuerdo a una publicación hecha por Almeyda *et al.* 2003 reporto en 4 variedades de naranja (Marss, Parson Brown, Tarocco y Hamlin) pertenecientes a un banco de germoplasma del estado de Nuevo León al CVd-III, pero no detectado en la variedad de Valencia, siendo este el primer reporte del CVd-III en esta variedad en el estado de Tamaulipas, sospechando que la distribución del CVd-III puede deberse a que no se encuentra regulado y no forma parte de los programas de certificación fitosanitaria de

cítricos en México. Posteriormente se llevó a cabo la implementación de la qRT-PCR con el sistema TaqMan de Applied Biosystem^{MR} con controles positivos al CDVd obteniendo una buena optimización de la técnica en base a las recomendaciones proporcionadas por el fabricante. Para la detección del CDVd (CVD-III) de las 50 muestras seleccionadas de las cuatro huertas comerciales ubicadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, 19 muestras resultaron positivas al CDVd, representando el 38 % del total de muestras utilizadas (Figura 2), observando que el sistema TaqMan es una de las técnicas moleculares que pueden ser de utilidad en la detección de viroides tal como lo describe Luigi y Faggioli, (2011) al utilizar este tipo de sistema en la detección del *Viroide del mosaico latente del durazno*.

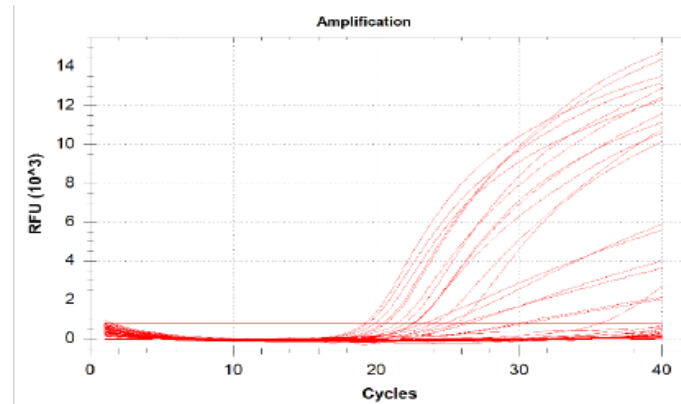


Figura 2. qRT-PCR sistema TaqMan para CDVd. Cada una de las líneas en forma de sigmoides, representan las amplificaciones de muestras positivas al CDVd, seleccionadas de cuatro huertas comerciales de los estados de Nuevo León y Tamaulipas.

4.6. Conclusiones

- Se obtuvo un protocolo de RT-PCR tiempo real con el sistema TaqMan de Applied Biosystem^{MR} para la detección del viroide III de los cítricos.
- De las 50 muestras seleccionadas de cuarto huertas comerciales de los estados de Nuevo León y Tamaulipas el 38 % resultaron positivas al CDVd utilizando la qRT-PCR con el sistema TaqMan.
- Hubo correspondencia entre los resultados obtenidos al comparar los sistemas RT-PCR convencional y qRT-PCR para la detección del viroide III de los cítricos.

4.7. Bibliografía

1. **Alvarado-Gómez O. G., Rocha P. M., Silvia V. S., Martínez S. J. P., Lee R. F., Rivera B. R. and Ruíz B. P.** 2000. Citrus Exocortis and Citrus cachexia viroids in comercial groves of Tahiti lime in Mexico. Fourteenth IOCV Conference-Viroids: 289-293.
2. **Almeyda L. I. H., Iracheta C. M. M., Jasso A. J., Curti D. S. A., Ruiz B. P. y Rocha P. M. A.** 2002. Re-examination of citrus viroids in tahiti lime un Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología. 20: 152-160.
3. **Almeyda L. I. H., Iracheta C. M. M., Orona C. F., Kahlke C. J. y Rocha P. M. A.** 2003. Extracción simple de ácidos nucleicos para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 21. Número 003: 364-369.
4. **Almeyda L. I. H., Rocha P. M. A., Iracheta C. M. M., Orona C. F. y Kahlke C. J.** 2007. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. Agrociencia. 41: 87-93.
5. **Bernard L. and Duran-Vila N.** 2005. An Improved Protocol for Extraction and RT-PCR Detection of Citrus Viroids. Sixteenth IOCV Conference. Pp. 452-455
6. **Garnsey S. M., Zies D. L., Irey M., Sierburth P. J., Semancik J. S., Levy L. and Hilf M. E.** 2002. Practical field detection of citrus viroids in Florida by RT-PCR. Fifteenth IOCV Conference-Viroids: 219-229.
7. **Ito T., Ieki H., Ozaki K., Iwanami T., Nakahara K., Hataya T., Ito T., Isaka M. and Kano T.** 2002. Multiple citrus viroids in citrus from japan and their ability to produce Exocortis-like symtoms in citron. Phythopathology. 92: 542-547.
8. **Murcia N., Bernard L., Serra P., Bani Hashemian S. M. and Duran-Vila N.** 2009. Molecular and biological characterization of natural variants of Citrus dwarfing viroid. Archives of Vitology. 154: 1329-1334.
9. **Palacio-Bielsa A., Foissac X. and Duran-Vila N.** 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. European Journal of Plant Pathology. 105: 897-903.
10. **Rizza S., Nobile G., Tessitori M., Catara A. and Conte E.** 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. Plant Pathology. 58:181-185.
11. **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. Journal of General Virology. 75: 3581-3584.
12. **Sieburth P. J., Irey M., Garnsey S. M. and Owens R. A.** 2002. The use of RT-PCR in the Florida Citrus viroid Indexing program. Fifteenth IOCV Conference-Viroids: 230-239.
13. **Tessitori M., La Rosa R., Di Serio F., Albanese G. and Catara A.** 2002. Molecular characterization of a Citrus viroid III (CVD-III) associated with Citrus dwarfing in Italy. Fifteenth IOCV Conference. Short Communication: 387-389.
14. **Van Vuuren S. P., Meyer J. B., Luttig M. and Manicom B. Q.** 2005. Search for a dwarfing isolates of Citrus viroid III for high density plantings and the posible association of CVD-III with gum pocket disease in South Africa. Sixteenth IOCV Conference-Viroids: 301-311.

15. **Wang, X., Zhou C., Tang K., Zhou Y. and Li K.** 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Plant Pathology* 124: 175-180.
16. **http://www.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/reporte_citricos.pdf**, 2010 (Fecha de consulta 11 de Abril de 2011).

CAPÍTULO 5

Clonación y secuenciación de tres viroides de cítricos

5.1. Resumen

Se seleccionaron cinco muestras positivas a cada uno de los viroides de cítricos: exocortis (CEVd), cachexia (HSVd) y enanismo (CDVd) de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, cuyos productos obtenidos por RT-PCR fueron clonados en un plásmido pGEM-T easy, secuenciados y comparados con datos del banco de genes del NCBI. Las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas en el presente trabajo tuvieron un 99 % de similitud con CEVd, 100 %, con HSVd y de un 96-100% con CDVd, al ser comparados con secuencias del banco de genes del NCBI. Adicionalmente se pudo determinar que los aislados de HSVd encontrados en los estados de Nuevo León y Tamaulipas corresponden a los tipos “a” y “c”. En el caso del viroide CDVd encontrado en la región corresponde al tipo “b”.

Palabras clave: CEVd, HSVd, CDVd, clonación, secuenciación

5.2. Summary

Five positive samples to citrus exocortis viroid (CEVd), citrus cachexia (HSVd) and citrus dwarfing (CDVd) from the states of Nuevo Leon and Tamaulipas Mexico, were amplified by RT-PCR and their products were cloned into a pGEM-T plasmid, then sequenced and compared with sequences from the NCBI Genebank. The sequences obtained were a 99% similar to CEVd, 100% to HSVd and 96-100% to CDVd. Isolates of HSVd found in the states of Nuevo Leon and Tamaulipas were "a" and "c" types, and CDVd was type "b".

Keywords: CEVd, HSVd, CDVd, sequencing

5.3. Introducción

México se ha distinguido por obtener el primer lugar en su producción de fruta de especies de cítricos como el limón persa y el limón mexicano, y entre el cuarto y quinto lugar en producción de toronja, mandarina y naranja dulce, siendo uno de los principales exportadores a nivel mundial, lo que le ha representando grandes ganancias para el país (USDA, 2013).

Los viroides son partículas infecciosas de cadena simple, circular de ARN las cuales carecen de una cubierta proteica y con actividad de ARN mensajero (mARN). Los viroides son pequeños patógenos de plantas que causan enfermedades de importancia económica en plantaciones comerciales de cítricos (Duran-Vila *et al.*, 1988). Desde los años 70's se han logrado identificar viroides en cítricos y a la fecha se reconocen seis especies (Hadidi *et al.*, 2003). Entre las especies de cítricos se encuentran *viroide de la exocortis de los cítricos* (CEVd), el *viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd, sinónimo CVd-II), el *viroide del enanismo de los cítricos* (CDVd, sinónimo CVd-III), *viroide de la hoja doblada de los cítricos* (CBLVd, sinónimo CVd-I) y el *viroide de la corteza agrietada de los cítricos* (CBCVd, sinónimo CVd-IV), y en años recientes se ha descrito el *viroide V de los cítricos*, CVD-V (Diener, 1979, Duran Vila *et al.*, 1988, Timmer *et al.*, 2000, Barbosa *et al.*, 2005, Serra *et al.*, 2008).

El diagnóstico de enfermedades mediante la utilización de plantas indicadoras y la expresión de los síntomas no permiten diferenciar entre especies de viroides, por lo que la utilización de las técnicas de biología molecular como la hibridación de ácidos nucleicos y la RT-PCR, son alternativas biológicas para la detección e identificación de las especies de viroides de los cítricos (Almeyda *et al.*, 2002, Ito *et al.*, 2002, Almeyda *et al.*, 2005, Bernard y Duran-Vila, 2005, Wang *et al.*, 2009).

Además del uso de plantas indicadoras, se ha utilizado la clonación y la secuenciación de ADN para identificar especies y variantes de patógenos. Como las partículas de los viroides de cítricos tienen una distribución irregular dentro de la planta huésped, la combinación de la RT-PCR con la clonación y la secuenciación permite identificar y diferenciar de manera más precisa los patógenos que causan una determinada enfermedad, además de poder detectar mutaciones o cambios que puedan sufrir en su genoma formando nuevos tipos, siendo la secuenciación de ácidos nucleicos una herramienta muy útil para la identificación de los distintos aislados de viroides de cítricos de una misma especie (Bernard L. y Duran-Vila N. 2005, Bagherian S. y Izadpanah K., 2010, Murcia N. *et al.*, 2009 y 2010, Sofy A. R., *et al.*, 2012, Owens R. A. *et al.*, 2000).

Debido a la escasa información que existe sobre los viroides en México, se realizó el presente trabajo con la finalidad de corroborar mediante secuenciación de ADN la identidad de las tres especies de viroides de cítricos más comunes en la región (CEVd, HSVd y CDVd), así como determinar los tipos de aislamientos de los viroides cachexia de los cítricos (HSVd) y enanismo de los cítricos (CDVd) que se encuentran en las plantaciones comerciales en áreas del noreste de México.

5.4. Materiales y Métodos

El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de Biociencia S. A. de C. V y en los laboratorios de Biotecnología y Ciencias Naturales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se seleccionaron 4 muestras positivas a cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd) procedentes del Ejido el Pozo, municipio de General Terán, Nuevo León, y una huerta (Hacienda El Mexiquito) ubicada en el Municipio de Montemorelos, Nuevo León; además del Campo Experimentan INIFAP y el Ejido “Puente Azul” ubicados en los municipios Rio Bravo y Hidalgo, Tamaulipas respectivamente. También se utilizaron controles positivos a cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd) los cuales fueron proporcionados por la empresa Biociencia S.A. A cada una de las muestras se les realizó extracción de ARN mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR} de acuerdo con las indicaciones del fabricante para posteriormente realizar las reacciones de RT-PCR en un solo paso con el uso de iniciadores específicos (Cuadro 1).

Nombre del iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
CEV-R CEV-F	cggggatccctgaagga ggaaacctggaggaagtgcg	371	Gross <i>et al.</i> (1982)
HSVd-R HSVd-F	ccggggctccttctcagtaagt ggcaactcttcagaatccagc	302	Sano <i>et al.</i> (1988)
CVd-III-H CVd-III-C	ttcgtcgacgacgacagga ggcagctaagttggtgacgc	296	Bernard y Duran-Vila. (2005)

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en la RT-PCR para la amplificación de viroides de los cítricos.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en una mezcla de 25 μ l con el kit Super Script one step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum^{MR} (Invitrogen). Las reacciones fueron formadas con una concentración de los iniciadores de 0.2 μ M excepto en el caso de CEVd (0.5 μ M) y HSV (0.1 μ M). El protocolo de las reacciones consistió en agregar 12.5 μ l de amortiguador 2 X, 1 μ l de una mezcla de iniciadores, 0.5 μ l de enzimas RT-Taq, y se completó el volumen total a 25 μ l con agua libre de nucleasas estéril. Los parámetros térmicos de las reacciones comienzan con una incubación inicial de 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización a 94 ° C por 2 min y posteriormente se repiten 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 94 ° C durante 30 s, un alineamiento a 58 ° C por 30 s y una extensión a 68 ° C por 45 s. finalmente se da una extensión final de 68 ° C durante 7 min. Los productos de la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio (50 ng/ml) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Cada uno de los fragmentos amplificados de las muestras positivas a los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd), fueron clonadas en un plásmido pGEM-T^{MR} (Promega) siguiendo el protocolo del fabricante, se adicionaron 5 μ l de buffer de reacción 2 X, 1 μ l de plásmido pGEM-T, 3 μ l de producto de RT-PCR de cada una de las muestras y 1 μ l de T4 ADN ligasa obteniendo un volumen final de 10 μ l, posteriormente se incubaron las reacciones durante 1 hr a 37 °C.

Posteriormente se llevó a cabo la transformación en células de *Escherichia coli* DH 5 α calciocompetentes (Promega) adicionando 2 μ l del producto de ligación a 50 μ l de células calcio competentes, se incubaron en hielo durante 20 min, se trataron en choque térmico durante 45 seg a 42 °C y se colocaron inmediatamente en hielo durante 2 min, se agregaron 950 μ l de medio SOC y se colocaron en incubación a 37 °C durante 1.5 hrs. Luego de la incubación se adicionaron 300 μ l del cultivo en cajas con medio LB agar más ampicilina 50 μ g/ ml y se colocaron en incubación durante toda la noche a 37 °C.

Finalmente se identificaron las colonias transformadas y se les extrajo el ADN plásmido mediante el kit de extracción Miniprep DNA Purification System^{MR} (Promega). Para comprobar la presencia de los insertos de interés, se realizaron reacciones de PCR con los iniciadores descritos en el Cuadro 1. Los productos amplificados por PCR fueron secuenciados y sus secuencias se analizaron con el programa Bioedit v7.2.3. comparándolas con secuencias disponibles en el banco de genes del NCBI.

5.5. Resultados y Discusión

Todos los productos amplificados por PCR a partir de muestras positivas a los viroides CEVd, HSVd y CDVd fueron exitosamente clonados en el plásmido pGEM-T^{MR} (Promega) y transformados en la bacteria *E. coli* DH 5 α (Fig. 1). Se corroboró por PCR la presencia de los insertos en el ADN plásmido de las clonas transformadas, obteniéndose los productos esperados de cada uno de los tres viroides, 371 pb para CEVd (Gross *et al.* 1982), 302 pb de HSVd (Sano *et al.* 1988) y 296 pb para CDVd (Bernard y Duran-Vila, 2005) (Fig. 2).

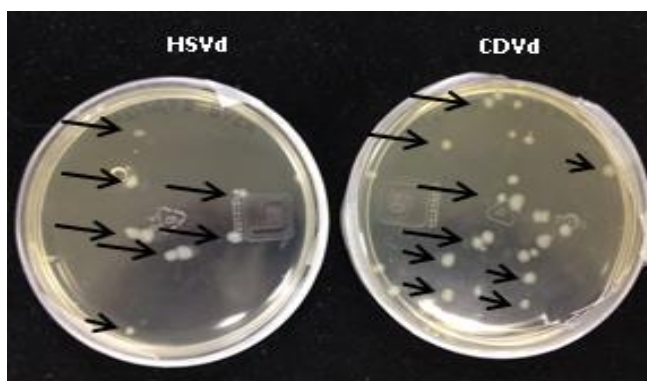


Figura 1. Colonias bacterianas conteniendo clonas de viroides de los cítricos. Las flechas señalan colonias de *E. coli* DH 5 α transformadas y crecidas en medio sólido LB + Ampicilina (50 μ g/ml).

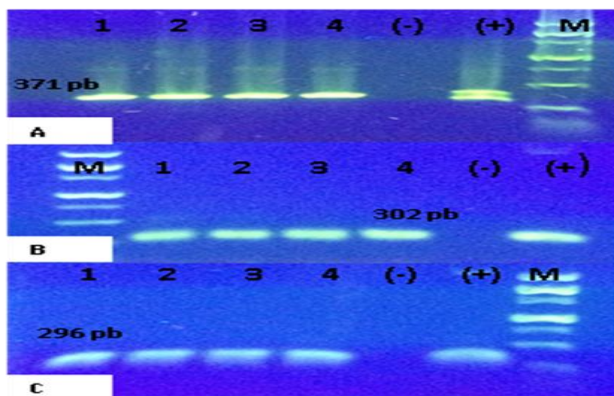


Figura 2. Productos de PCR amplificados a partir de ADN plásmido con insertos de viroides. A) CEVd, B) HSVd y C) CDVd. Líneas 1 y 2 pertenecen a los municipios de Gral. Terán y Montemorelos, Nuevo León, 3 y 4 a los municipios de Hidalgo y Rio Bravo Tamaulipas, (-)= Control negativo, (+)= Control positivo, M= Marcador de peso molecular de 3 Kb.

El análisis de los productos amplificados de CEVd mediante secuenciación mostró un porcentaje de identidad de un 99 % con una cobertura de 98-99 % para las muestras de General Terán; Montemorelos, Nuevo León e Hidalgo, Tamaulipas, teniendo su mayor similitud con un aislado de China con numero de accesoión DQ431993.1.

Las secuencias de HSVd, tuvieron un 99 % de identidad y una cobertura de 98-100 % con HSVd las accesiones EU931256.1, GQ246198.1 y HM357802.1 correspondiendo al aislado HSVd-IIa cuyas muestras procedían de predios ubicados en los municipios de General Terán, Nuevo León y Rio Bravo, Tamaulipas. La muestra procedente de Montemorelos, Nuevo León tuvo un 99 % de identidad y un 100 % de cobertura con el aislado HSVd-IIc con números de accesoión AF131250.1 y HM357802.1, sin embargo para la muestra de Hidalgo, Tamaulipas se obtuvo un 82 % de identidad con el aislado HSVd-IIc con número de accesoión HM357802.1. A diferencia a lo encontrado por Sofy *et al* (2012) y Bagherian y Izadpanah (2010), el aislado que se encuentra en el municipio de Hidalgo, Tamaulipas pueda ser diferente a los aislados que actualmente existen como son el HSVd tipos a, b y c, ya que a diferencia de los aislados actuales este aislado tiene una diferencia de 7 nt.

Al analizar la secuencia de CDVd obtuvimos un 100 % de identidad y un 99 % de cobertura con las accesiones AJ630358.1 y EU872280.1 publicadas en el GenBank, las cuales corresponden al tipo b, dichas muestras procedían de los municipios de Nuevo León y Tamaulipas. No se observó variabilidad entre muestras con una talla de 294-298 nt de los 296 nt \pm 2 nt que conforman el genoma del viroide del enanismo de los cítricos (CDVd). Estos resultados son similares a los obtenidos por Rakowski *et al.* (1994), Tessitori *et al.* (2005) y Murcia *et al.* (2010).

Al comparar nuestras secuencias entre ellas para cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd) utilizando el programa ClustalW alignment del Software Bioedit v7.2.3, se formaron dendogramas y alineamientos para cada uno de los tres viroides de los cítricos; en el caso de CEVd se observó un porcentaje de identidad de 81.6-98.9 %, Las secuencias del HSVd tuvieron un porcentaje de identidad entre muestras de 75.1-96.3 % y para el caso de CDVd se obtuvo un porcentaje de identidad del 94.9-99.3 % (Figs. 3, 4 y 5)

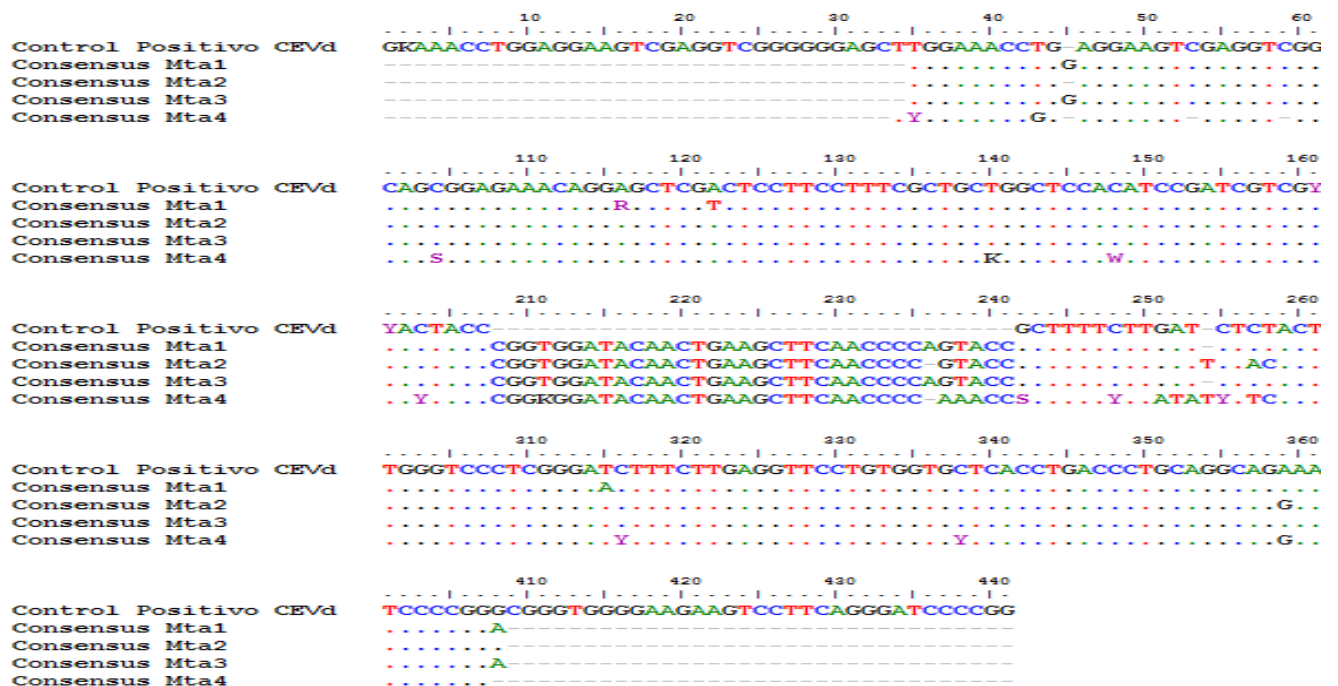




Figura 3. **Alineamientos y dendogramas de CEVd.** Muestras 1, 2, 3 y 4: aislados de Hidalgo, Tamaulipas, General Terán, N. L., Montemorelos, N. L. y Rio Bravo, Tamaulipas, respectivamente.

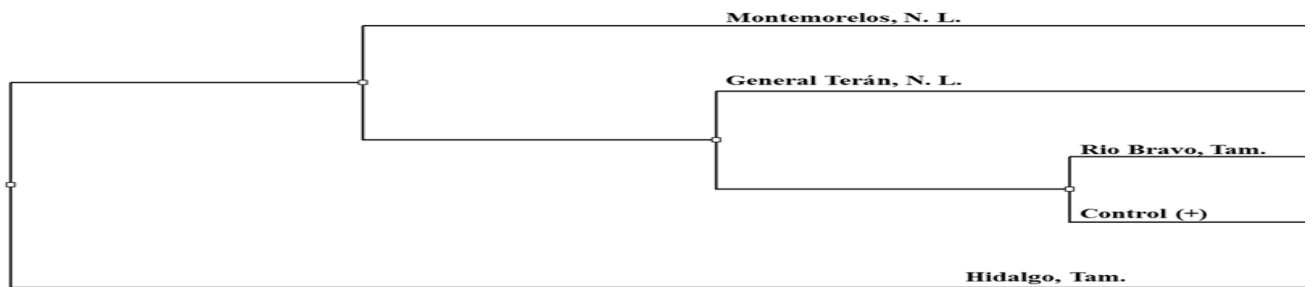
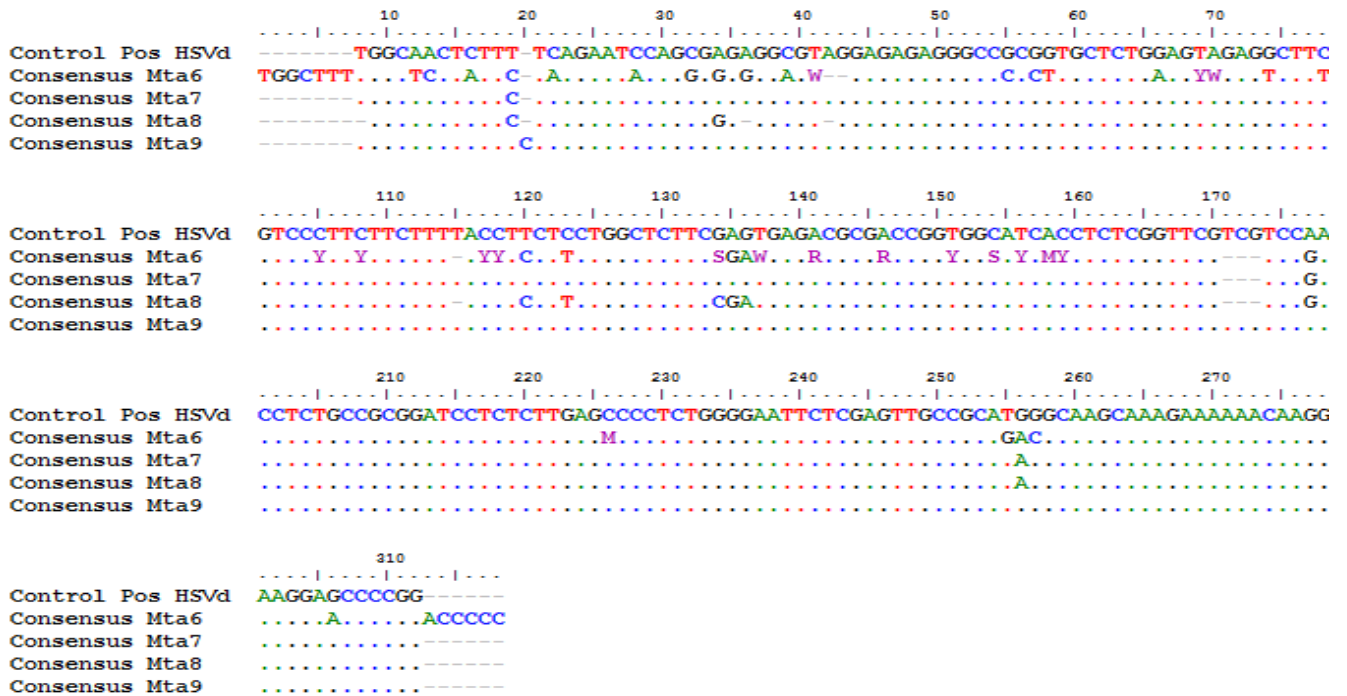


Figura 4. **Alineamientos y dendogramas de HSVd.** Muestras 6, 7, 8 y 9 son aislados de Hidalgo, Tamaulipas, General Terán, N. L., Montemorelos, N. L. y Rio Bravo, Tamaulipas, respectivamente.

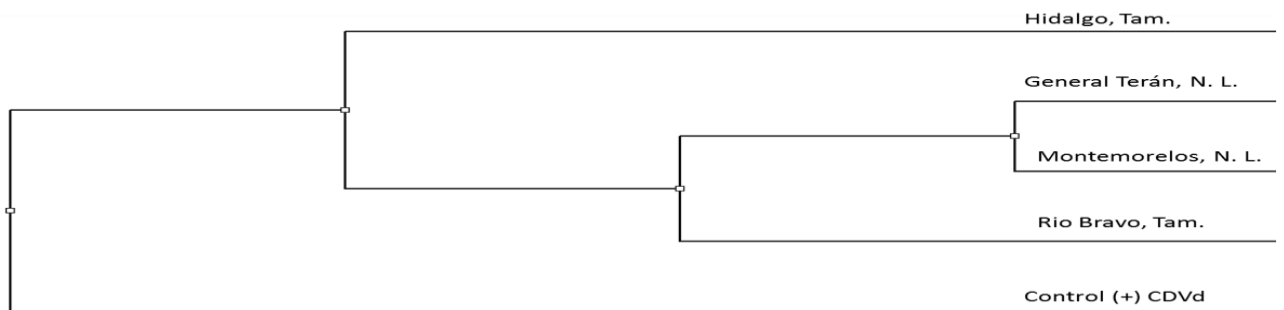
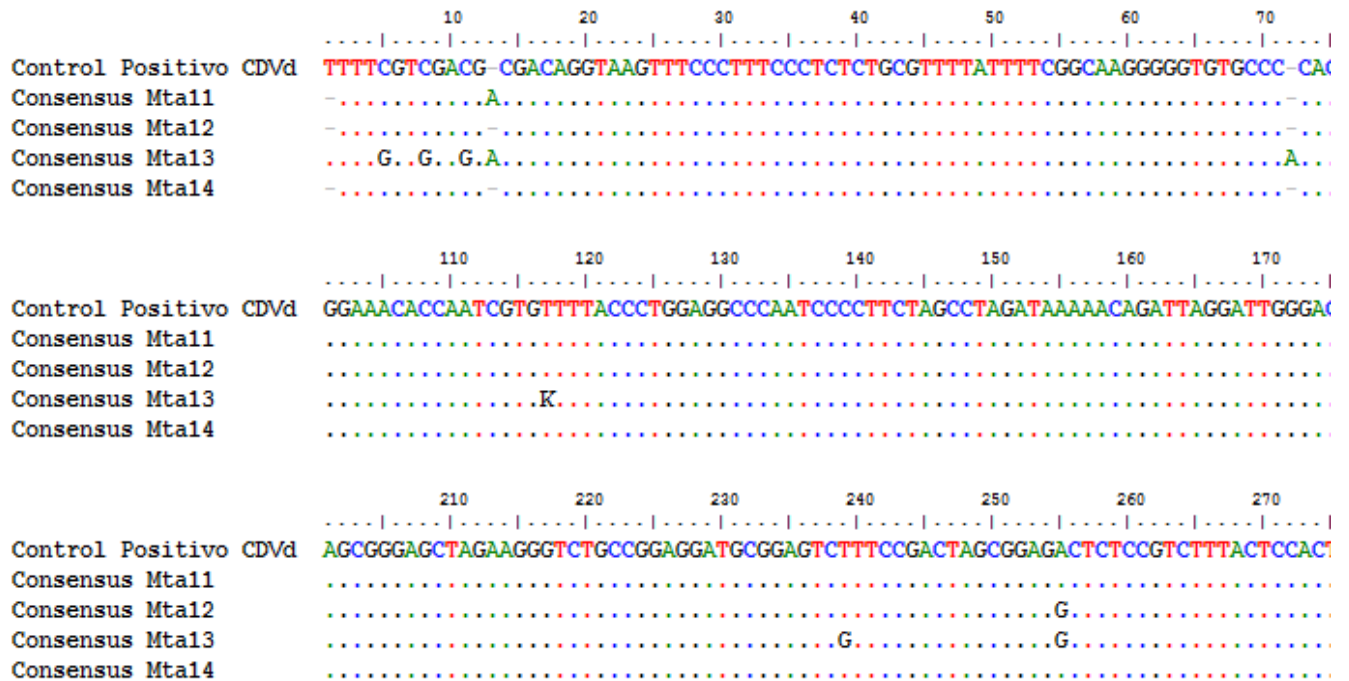


Figura 5. Alineamientos y dendrograma de CDVd. Muestras 11 al 14 corresponden a aislamientos de Hidalgo, Tamaulipas, General Terán, N. L., Montemorelos, N. L. y Rio Bravo, Tamaulipas, respectivamente.

El análisis de secuencias muestran que entre los viroides CEVd y HSVd podemos encontrar variabilidad genética entre los aislamientos procedentes de los Estados de Nuevo León y Tamaulipas, dichos datos concuerdan al encontrar cambios de nucleótidos en los dominios de la estructura del genoma del viroide cuyos datos son similares a los obtenidos por Murcia *et al.* (2010) y Sofy *et al.* (2012), sin embargo para CDVd es un caso aislado al no contener tanta variabilidad genética y al solo encontrarse el asilado b, estos datos difieren con los obtenidos por Murcia *et al.* (2009) quién encontró mayor variabilidad genética para CDVd.

5.6. Conclusiones

- Se caracterizaron tres viroides de los cítricos por medio de secuenciación de ADN obteniendo de un 99% de identidad para CEVd, un 100% de identidad para HSVd y de un 99-100% de identidad para CDVd, al comparar las secuencias con el banco de genes del NCBI.
- Al comparar las secuencias dentro de especies, se observó un porcentaje de identidad de 81.6-98.9 % para CEVd, de un 75.1-96.3 % para HSVd y de un 94.9-99.3 % para CDVd.
- Los aislamientos de HSVd encontrados en los municipios de Hidalgo, Tamaulipas y Montemorelos, Nuevo León fueron de tipo HSVd-IIc; y los encontrados en Rio Bravo, Tamaulipas y General Terán, Nuevo León fueron HSVd-IIa.
- El aislamiento de CDVd encontrado en los cuatro municipios muestreados de los estados de Tamaulipas y Nuevo León fue de tipo CDVd-IIIb.

5.7. Bibliografía

1. **Almeyda L. I. H., Iracheta C. M. M., Jasso A. J., Curti D. S. A., Ruiz B. P. and Rocha P. M. A.** 2002. Re-examination of citrus viroids in tahiti lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 152-160.
2. **Almeyda L. I. H., Rocha P. M. A., Iracheta C. M. M., Orona C. F. y Kahlke C. J.** 2005. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia*. 41: 87-93.
3. **Bagherian S. S. A. and Izadpanah K.** 2010. Tow novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. 21st Internacional Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops. pp. 105-113.
4. **Barbosa, C.J.** 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89: 749-754.
5. **Bernard L. and Duran-Vila N.** 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. *Proceedings Sixteenth IOCV Conference*. pp: 452-455.

6. **Diener, T.O.** 1979. Viroids and Viroid Diseases. Editorial Wiley-Interscience. pp: 25-50.
7. **Duran-Vila N., Pina J. A., Ballester J. F., Juarez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante R. and Semancik J. S.** 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. L. W. Timmer S. M. Garnsey L. Navarro (eds.). Tenth OICV Conference. pp: 152-164
8. **Hadidi A., Flores R. Randles J. W. and Semancik J. S.** 2003. Viroids. Editorial Science Publisher, Inc. pp 178-194.
9. **Ito T., Ieki H., Ozaki K., Iwanami T., Nakahara K., Hataya T., Ito T., Isaka M. and Kano T.** 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.
10. **Kim A., Choi W., Chung Y., Kim K., Jee Y., Cho H. and Lee J.** 2007. Utility of RT-PCR-based Dot-blot hybridization for detecting and genotyping Echoviruses. *Journal of Bacteriology and Virology* 37: 153-160.
11. **Murcia N., Serra P. Olmos A. and Duran-Vila N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes* 23: 95-102
12. **Murcia N., Bernard L., Caicedo A. and Duran-Vila N.** 2010. Citrus viroids in Colombia. *Proceedings of the 17th IOCV Conference.* pp: 158-166.
13. **Palacio-Bielsa A., Foissac X. and Duran-Vila D.** 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. *European Journal of Plant Pathology* 105: 897-903
14. **Owens R. A., Yang G., Gundersen-Rindal D., Hammond R. W., Candresse T. and Bar-Joseph M.** 2000. Both point mutation and RNA recombination contribute to the sequence diversity of citrus viroid III. *Virus Genes* 20: 243-252.
15. **Promega.** Sin fecha. pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems, Technical Manual. 28p.
16. **Rakousky A. G., Szychowski J. A., Avena Z. S. and Semancik J. S.** 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *Journal of General Virology* 75: 3581-3584.
17. **Serra, P., Erias, M., Bani-Hashemian, Murcia N., Kitajima E.W., Daros J.A., Flores, R., and Duran-Vila, N.** 2008. Citrus viroid V: Occurrence, host range,

- diagnosis and identification of new variants. *Journal of Phytopathology* 98: 1199-1204.
18. **Sofy A. R., Soliman A. M., Mousa A. A. and El-Dougdoug Kh. A.** 2012. Molecular characterization and bioinformatics analysis of viroid isolate associated with citrus gummy bark disease in Egypt. *International Journal of Virology* 8: 133-150.
 19. **Tessitori M.** 2005. Analysis of the Progeny of an Italian Isolate of Citrus Viroid III. *Proceedings of the 16th IOCV Conference*. pp: 460-462.
 20. **Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Graham, J.H.** 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. Segunda edición. The American Phytopathological Society. pp. 51-55.
 21. **Vidalakis G., Gumpf D. J., Bash J. A. and Semancik J. S.** 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
 22. **Wang, X., Zhou C., Tang K., Zhou Y. and Li K.** 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Plant Pathology* 124: 175-180.
 23. **USDA** <http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/citruswm/citruswm-07-26-2013.pdf> (Consultado el 30 de Octubre de 2013)

Capítulo 6

Detección de viroides de cítricos por hibridación de ARN

6.1. Resumen

Se seleccionaron tres muestras positivas a cada uno de los siguientes viroides de cítricos: viroide exocortis (CEVd), viroide cachexia (HSVd) y viroide del enanismo (CDVd), mismas que fueron recolectadas en huertas de los estados de Nuevo León y Tamaulipas. Después de realizar las reacciones de RT-PCR en todas las muestras, los productos fueron clonados en el plásmido pGEM-T para la síntesis de sondas marcadas con digoxigenina Dig dUTP para cada uno de los viroides. Se estandarizó la técnica de hibridación Dot-blot utilizando un sustrato colorimétrico basado en NBT/BCIP, y se evaluó su eficiencia con las 10 muestras problema. El protocolo de hibridación obtenido resultó efectivo en la detección de los 3 viroides de cítricos con extractos crudos de muestras vegetales de campo.

Palabras clave: CEVd, HSVd, CDVd, Hibridación Dot-blot

6.2. Summary

Three positive samples were selected for each of the following viroids, citrus exocortis viroid (CEVd), citrus cachexia viroid (HSVd) and citrus dwarf viroid (CDVd) from the states of Nuevo Leon and Tamaulipas. The products obtained by RT-PCR were cloned into a pGEM-T plasmid for the synthesis of probes digoxigenin-labeled dUTP for each of the viroids. We standardized the Dot-blot hybridization technique using a colorimetric substrate based on NBT / BCIP and was evaluated with problem samples. The protocol for nucleic acid hybridization Dot-blot allows the detection of CEVd, HSVd and CDVd in field samples.

Keywords: CEVd, HSVd, CDVd, Dot-blot hybridization

6.3. Introducción

México se ha distinguido por obtener el primer lugar en su producción de especies de cítricos como son: limón persa, limón mexicano, y el cuarto lugar en producción de

especies de: toronja, mandarina y naranja dulce, siendo uno de los principales exportadores a nivel mundial, representando grandes ganancias para el país (USDA, 2013).

Los viroides son partículas infecciosas de cadena simple, circular de ARN las cuales carecen de una cubierta proteica y con actividad de ARN mensajero (ARNm). Los viroides son pequeños patógenos de plantas que causan enfermedades de importancia económica en plantaciones comerciales de cítricos (Duran-Vila *et al.*, 1988). A partir de los años 70's se han logrado identificar cinco especies de viroides de cítricos (Hadidi *et al.*, 2003), entre las especies de cítricos se encuentran *viroide de la exocortis de los cítricos* (CEVd), el *viroide del enanismo del lúpulo* (HSVd), el *viroide del enanismo de los cítricos* (CDVd, sinónimo de CVd-III), *viroide de la hoja doblada de los cítricos* (CBLVd, sinónimo de CVd-I) y el *viroide de la corteza agrietada de los cítricos* (CBCVd, sinónimo de CVd-IV); y mas recientemente se describió el *viroide V de los cítricos*, CVd-V (Diener, 1979, Duran Vila *et al.*, 1988, Timmer *et al.*, 2000, Barbosa *et al.*, 2005, Serra *et al.*, 2008).

Por sus propiedades físicas y biológicas los viroides de los cítricos se encuentran ubicados dentro de la familia de los Pospiviroidae, compuestos de ARN monocatenario cerrado covalentemente, de polaridad positiva con replicación autónoma utilizando la maquina transcripcional de las células de su hospedero. El tamaño de los viroides es de alrededor de 246 a 402 nt, en forma de varilla. Actualmente se conocen tres variantes del CDVd que son llamadas: a, b y c. Los síntomas que ocasionan los viroides en la planta indicadora Cidra Etrog 861-S1, son enanismos, agrietamientos en la corteza, daños en las nervaduras de las hojas, pecíolo, picado de la corteza, entre otros (Vidalakis *et al.* 2004, Wang *et al.*, 2009, Bagherian y Izadpanah, 2010).

El diagnóstico de enfermedades en plantas mediante la utilización de plantas indicadoras y la expresión de los síntomas de las mismas no permiten identificar la especie de viroide, por lo tanto la utilización de las técnicas de biología molecular como la hibridación de ácidos nucleicos y la RT-PCR son alternativas para la detección e identificación de las especies de viroides de los cítricos. Por desgracia, la experiencia acumulada a lo largo de los años ha demostrado que los falsos positivos debido a la

contaminación de amplificación, y falsos negativos debido a que no se genere un ADNc de tamaño adecuado durante la transcripción inversa, son frecuentes. Como consecuencia, se ha recomendado que al menos dos métodos de diagnóstico se utilicen para fines de identificación de viroides (Ito *et al.*, 2002, Bernard y Duran-Vila, 2005, Murcia *et al.*, 2009 y 2010).

Para el análisis de ácidos nucleicos de plantas infectadas por viroides, se han utilizado las técnicas de electroforesis, hibridación molecular y RT-PCR como alternativas a la indexación biológica. Sin embargo la sensibilidad y confiabilidad de estos métodos, utilizados rutinariamente en la detección de viroides de cítricos depende de la concentración y distribución del viroide en la planta hospedera. Los viroides de los cítricos no se encuentran distribuidos de manera uniforme dentro de las especies de los cítricos y sus concentraciones varían considerablemente en la cantidad de partículas en cada una de las especies y esto dependerá también de las condiciones ambientales en que se encuentren (Palacio *et al.*, 1999).

Se han desarrollado métodos alternativos para la detección de viroides de cítricos, entre los cuales se encuentra la hibridación de ácidos nucleicos por medio de membranas. Entre las variantes de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra la tipo Dot-blot. Esta prueba consiste en la utilización de membranas de nylon o de nitrocelulosa y con la utilización de sondas específicas se logra detectar partículas de un patógeno en particular, esta técnica no necesariamente requiere de una extracción de ácidos nucleicos, pudiendo funcionar a partir de extractos crudos mediante el uso de una solución salina. Las muestras son unidas covalentemente a la membrana a temperaturas específicas, y posteriormente la sonda se une a la muestra que al utilizar un conjugado enzimático y un sustrato dan una reacción colorimétrica indicando la presencia del patógeno o la partícula objetivo (Bagherian y Izadpanah , 2010; Bernard y Duran-Vila, 2005; Kim *et al.*, 2007; Palacio *et al.*, 1999; Sofy *et al.*, 2012).

Debido a los avances que existen sobre la técnica de hibridación de ARN y sus aplicaciones a casos prácticos, así como la necesidad de tener alternativas confiables para

su uso rutinario o de corroboración en muestras problema y/o en programas de certificación, se evaluó la técnica Dot-blot con sustrato colorimétrico en el presente trabajo.

Hipótesis

Los viroides CEVd, HSVd y CDVd pueden ser detectados en plantas mediante hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas.

Objetivo

Estandarizar la técnica de hibridación de ácidos nucleicos y determinar la presencia de los viroides exocortis (CEVd), cachexia (HSVd) y enanismo de los cítricos (CDVd), mediante la técnica de hibridación de ARN en muestras de árboles de huertos comerciales.

6.4. Materiales y Métodos

6.4.1. Controles positivos y material vegetal

El presente proyecto de investigación se realizó en las instalaciones de Biociencia S. A. de C. V y en los laboratorios de Biotecnología y Ciencias Naturales de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Se utilizaron controles positivos de cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd) proporcionados por el laboratorio Biociencia S. A. de C. V., posteriormente fueron seleccionados 10 muestras de campo positivas a cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd), procedentes del municipio de General Terán, Nuevo León (Ejido “El Pozo”) y una huerta (Hacienda “El Mexiquito”) ubicada en el Municipio de Montemorelos, Nuevo León, además del Campo Experimentan del INIFAP y el Ejido “Puente azul” ubicados en los municipios Rio Bravo e Hidalgo, Tamaulipas.

6.4.2. Extracción de ARN y reacciones de RT-PCR

Se seleccionaron tres muestras positivas a cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd). Se realizó la extracción de ARN mediante el método comercial Trizol Reagent^{MR} de acuerdo con las indicaciones del fabricante para posteriormente realizar las reacciones de RT-PCR en un solo paso con el uso de iniciadores específicos (Cuadro 1).

Adicionalmente se realizó un extracto crudo de ARN con ácido cítrico a partir de 50 a 150 mg de corteza en 10 muestras seleccionadas.

Nombre del Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
CEV-R CEV-F	ccggggatccctgaagga ggaaacctggaggaagtgc	371	Gross <i>et al.</i> (1982)
HSVd-R HSVd-F	ccggggctcctttctcaggttaagt ggcaactcttctcagaatccagc	302	Sano <i>et al.</i> (1988)
CVd-III-H CVd-III-C	ttcgtcgacgacgacaggtta ggcagctaagttggtgacgc	296	Bernard y Duran-Vila. (2005)

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para el RT-PCR en un solo paso para viroides de los cítricos

Las reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo en una mezcla de 25 µl con un kit de Super Script one step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum^{MR} (Invitrogen). Las reacciones fueron formadas con una concentración de los iniciadores de 0.2 µM para CDVd, 0.5 µM para CEVd y 0.1 µM para HSVd. El protocolo óptimo de RT-PCR consistió de 12.5 µl de buffer 2 X, 1 µl de la mezcla de iniciadores, 0.5 µl de enzima RT-Taq y completar el volumen total con agua libre de nucleasas estéril. Los parámetros de temperatura de la RT-PCR utilizado, comienza con una incubación inicial de 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización a 94 ° C por 2 min y 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 94 ° C durante 30 s, un alineamiento del iniciador a 58 ° C por 30 s, una extensión a 68 ° C por 45 s y una extensión final de 68 ° C durante 7 min. Los productos de la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio (50 ng/ml) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

6.4.3. Síntesis de sondas e hibridación de ARN

Los fragmentos amplificados de los controles positivos a cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd), fueron clonados en el plásmido pGEM-T^{MR} (Promega) y transformado en células de *Escherichia coli* DH 5α calcio competentes (Promega) produciendo las células transformantes en un medio Agar LB con ampicilina (50 µg/ml). Cada uno de las células transformadas se les extrajo el ADN plásmido mediante el kit de

extracción Minipreps DNA purification system^{MR} (Promega). Se realizaron las reacciones de PCR con los iniciadores específicos (Cuadro 1) para asegurar la presencia del inserto en las clonas. Las clonas de los controles positivos fueron utilizadas para sintetizar las sondas de cada uno de los viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd) para ser utilizados en la hibridación de ácidos nucleicos. Cada control positivo fue llevada en una mezcla de reacción de 25 µl de PCR adicionando 1 µl de Dig dUTP^{MR} (Roche). Los parámetros de temperatura de la PCR, comienzan con una desnaturalización inicial a 92 ° C durante 2 min y 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 94 ° C durante 30 s, un alineamiento del iniciador a 58 ° C por 30 s, una extensión a 68 ° C por 45 s y una extensión final de 68 ° C durante 7 min. Los productos amplificados de la PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio (50 ng/ml) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Una vez obtenida la sonda se estandarizó el protocolo de hibridación de ácidos nucleicos Dot-blot con muestras positivas a los tres viroides de los cítricos. Se colocaron en una membrana de nylon^{MR} (Sigma) cargada positivamente 5 µl de cada muestra macerada en 2 volúmenes de una solución al 50 mM de ácido cítrico, y fueron incubadas a 80 ° C durante 2 hrs, posteriormente la membrana fue colocada en un tubo de hibridación, se agregó 10 ml de una solución de prehibridación (formamida, SDS 5 %, SSC 20x, N-lauroylsarcosina 10 %, solución de bloqueo 10 %) y se colocó a 68 ° C por 1 hr, después se adicionaron 10 ml de solución de hibridación con 100 µl de sonda de cada uno de los tres viroides de los cítricos y se incubó a 50 ° C toda la noche, se realizaron cuatro lavados, posteriormente se adicionaron 5 ml de una solución de conjugado (solución de bloqueo 10 %, ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M) y anticuerpo Anti-Dig^{MR} (Roche) y para la detección colorimétrica se agregó una solución de sustrato NBT/BCIP^{MR} (Roche).

6.5. Resultados y Discusión

La clonación en el plásmido pGEM-T (Promega^{MR}) fue satisfactoria para cada una de las muestras positivas a los viroides CEVd, HSVd y CDVd, igual que la transformación en la bacteria *E. coli* DH 5 α , lo cual fue demostrado por la amplificación de los insertos correspondientes. Se obtuvieron los productos esperados para cada uno de los tres viroides

con un talla de 371 pb para CEVd (Gross *et al.* 1982), 302 pb de HSVd (Sano *et al.* 1988) y 296 pb para CDVd (Bernard y Duran-Vila, 2005) con los iniciadores específicos descritos anteriormente.

En el caso de las muestras problema, la hibridación de ácidos nucleicos mediante la técnica de Dot-blot, fue satisfactoria obteniendo reacciones positivas en las muestras de los predios Ejido “El Pozo” y Hacienda “El Mexiquito” procedentes de los municipios de Gral. Terán y Montemorelos, Nuevo León, además de los predios “Puente Azul” y el Campo Experimental del INIFAP de las ciudades de Hidalgo y Rio Bravo, Tamaulipas respectivamente donde se encontraron cada uno de los tres viroides de los cítricos (CEVd, HSVd y CDVd), obteniendo en todos los casos reacción positiva a cada uno de los tres viroides de los cítricos, sin embargo la velocidad de reacción con el sustrato tardó varias horas, esto se puede deber a la baja cantidad que hay del viroide dentro de la muestra dichos. Los resultados concuerdan con los obtenidos por Bagherian y Izadpanah (2010) y con Palacio *et al.* (1999) con la diferencia que obtuvieron mejores resultados al utilizar la Cidra Etrog 861-S1 como un amplificador biológico de los viroides, siendo recomendable utilizar plantas indicadoras para obtener mejores resultados con la técnica de hibridación de ácidos nucleicos (Figura 1).

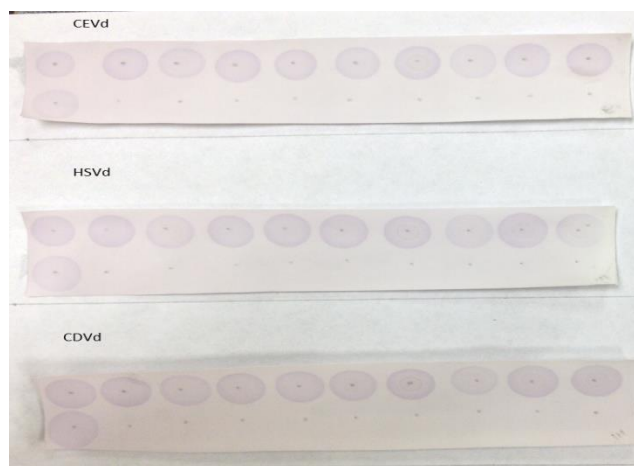


Figura 1. Hibridación de ácidos nucleicos Dot-Blot de CEVd, HSVd y CDVd. Cada uno de los puntos purpuras indican la reacción de la muestra + sonda Dig dUTP + conjugado Anti-Dig + sustrato NBT/BCIP.

6.6. Conclusiones

- Se obtuvo un protocolo de hibridación de ácidos nucleicos para los viroides CEVd, HSVd y CDVd con resultados satisfactorios.
- Se determinó la presencia de los viroides CEVd, HSVd y CDVd mediante hibridación de ácidos nucleicos Dot-blot en muestras de campo.

6.7. Bibliografía

1. **Bagherian S., S. A. and Izadpanah, K.** 2010. Two novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. 21st International Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops. pp. 105-113.
2. **Barbosa, C.J., Pina J. A., Pérez-Panadés J., Bernad L., Serra P., Navarro L., and Duran-Vila N.** 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89: 749-754.
3. **Bernard L. and Duran-Vila N.** 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. In: *Proceedings of the 16th IOCV Conference*. pp: 452-455.
4. **Diener, T.O.** 1979. *Viroids and Viroid Diseases*. Editorial Wiley-Interscience. pp: 25-50.
5. **Duran-Vila N., Pina J. A., Ballester J. F., Juarez J., Roistacher C. N., Rivera-Bustamante R. and Semancik J. S.** 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid-RNAs. In: L. W. Timmer, S. M. Garnsey, and L. Navarro (eds). *Proceedings of the 10th IOCV Conference*. pp: 152-164.
6. **Gross, H. J., Krupp, G., Domdey, H., Raba, M., Jank, P., Lossow, C., Alberty, H., Kamm, K. and Sanger H. L.** 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid. *European Journal of Biochemistry* 121, 249-257.
7. **Hadidi A., Flores R. Randles J. W. and Semancik J. S.** 2003. *Viroids*. Editorial Science Publisher, Inc. pp 178-194.
8. **Ito T., Ieki H., Ozaki K., Iwanami T., Nakahara K., Hataya T., Ito T., Isaka M. and Kano T.** 2002. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.
9. **Kim A., Choi W., Chung Y., Kim K., Jee Y., Cho H. and Lee J.** 2007. Utility of RT-PCR-based Dot-blot hybridization for detecting and genotyping Echoviruses. *Journal of Bacteriology and Virology* 37: 153-160.
10. **Murcia N., Serra P. Olmos A. and Duran-Vila N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes* 23: 95-102.
11. **Murcia N., Bernard L., Caicedo A. and Duran-Vila N.** 2010. Citrus viroids in Colombia. In: *Proceedings of the 17th Conference IOCV*. pp: 158-166.
12. **Palacio-Bielsa A., Foissac X. and Duran-Vila D.** 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. *European Journal of Plant Pathology* 105: 897-903.

13. **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 Research* 16:347.
14. **Serra, P., Erias, M., Bani-Hashemian, Murcia N., Kitajima E.W., Daros J.A., Flores, R., and Duran-Vila, N.** 2008. Citrus viroid V: Occurrence, host range, diagnosis and identification of new variants. *Journal of Phytopathology* 98:1199-1204.
15. **Sofy A. R., Soliman A. M., Mousa A. A. and El-Dougdoug Kh. A.** 2012. Molecular characterization and bioinformatics analysis of viroid isolate associated with citrus gummy bark disease in Egypt. *International Journal of Virology* 8: 133-150
16. **Timmer, L.W., Garnsey, S.M., and Graham, J.H.** 2000. Compendium of Citrus Diseases. Segunda edición. The American Phytopathological Society. pp. 51-55.
17. **Vidalakis G., Gumpf D. J., Bash J. A. and Semancik J. S.** 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
18. **Wang X., Zhou C., Tang K., Zhou Y. and Li K.** 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Plant Pathology* 124: 175-180.
19. **USDA** <http://usda01.library.cornell.edu/usda/current/citruswm/citruswm-07-26-2013.pdf> (Consultado el 30 de Octubre de 2013)

RESUMEN CURRICULAR



M. C. César Enrique Guerrero Gámez

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas

Tesis: **Detección e Incidencia de Viroides en Cítricos Mediante Técnicas Moleculares en Zonas Productoras del Noreste de México**

Campo de Estudio: Parasitología Agrícola

Lineas de Investigación: Parasitología, Biotecnología

Datos Personales: Nacido en la ciudad de Monterrey, Nuevo León, el 10 de Octubre de 1979, hijo de Enriqueta Gámez Martínez y Leobardo Guerrero González.

Formación Académica: Egresado de la escuela superior Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el 2004

Experiencia profesional:

- Profesor eventual de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Escobedo, Nuevo León.
- Profesor de la preparatoria No. 1 de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en Apodaca, Nuevo León.
- Gerente de Calidad en la empresa Biociencia S. A. de C. V., en Monterrey, Nuevo León.
- Encargado de área de virus, como signatario propuesto, en el Laboratorio Central Regional A. C. dependiente de la Union Ganadera Regional en Guadalupe, Nuevo León.

Publicaciones:

Revistas dentro del padrón de CONACyT: 2 artículos

Revistas de comunicación universitaria: 1

Notas Científicas: 1

Resumen en extenso a congresos: 6

Distinciones:

Mención honorífica por el trabajo de investigación realizado con opción a tesis del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola, en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Premio a la mejor tesis de maestría en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León.