Facultad de Ciencias Universidad de la República

"Obtención y Validación de la sonda molecular del *Viroide Tubérculo Ahusado de la papa* (PSTVd) para la detección en análisis masivos"

Tesis de Grado:
Previa la obtención del Título de:

Licenciada en Bioquímica

Presentada por: Dirigida por:

Ana Carolina Palavé Seoane Ing. Agr. Gabriela Pagliano MSc.

Montevideo - Uruguay
2011

Índice.....1

Agradecimientos.....4

Lista de Abreviaturas.....5

Resumen.....6

1. Introducción.....7

1.1 Definición de viroides.....8
1.1.2 Genoma viroidal.....9
1.1.3 Estructura viroidal.....9
1.1.4 Dominios en la molécula viroidal…….10
1.1.5 Clasificación de los viroides.....11
1.1.6 Replicación..... 13
1.1.7 Tasa de Mutación e Hipotesis Evolutiva……...14
1.2 Introducción de Viroide del Tuberculo ahusado de la papa (PSTVd)……..15
1.2.1 Reseña historica.....15
1.2.2 Localización subcelular.....15
1.2.3 Patogenesis a nivel molecular.....16
1.2.4 Distribución georáfica.....16
1.2.5 Hospederos.....16
1.2.6 Sintomatologia.....16
1.2.7 Rol del Medio Ambiente.....17
1.2.8 Diseminación.....18
1.3 Procedimiento para el diagnóstico de viroides…….18
1.3.1 Detección del viroide del Tubérculo Ahusado de la Papa…….……...19
1.3.2 Pruebas Biológicas……19
- Prueba normal del tomate.....19
- Prueba de Yang y Hookar…….20
- Prueba de confrontación.....20
1.3.3 Métodos Moleculares……....20
- Electroforesis en gel de acrilamida y poliacrilamida (PAGE)…….20
- Diagnóstico por PCR……....20
- Diagnóstico basado en hibridacion molecular……. 21
1.4 Importancia económica…… 21
1.5 Control…… 21
1.6 Situación en Uruguay ……...22

2. *Objetivos*……..23

2.1 Objetivo general…….24
2.2 Objetivos específicos…..……...24

3. *Materiales y Métodos*…….25

3.1 Material vegetal utilizado para la replicación del viroide……..25
-Condiciones de crecimiento…….…….25
-Inoculación de plantas de cámara…….27
3.2 Extracciones de ARN viroidal…….…….27
a-Extracción por metodología Tripure.....27
b-Extracción de ácidos nucleicos según protocolo de R. Flores...……....28
c-Extracción de ácidos nucleicos según protocolo de Fonseca…..…….....28
d-Extracción por metodología CIP……...28
3.3 Transcripción reversa (RT) y amplificación por PCR…….29
- Síntesis de primera cadena……...29
- Amplificaciones vía PCR…… ……29
3.4 Clonado del fragmento amplificado…….30
3.5 Transformación y selección de colonias recombinantes……..30
3.6 Secuenciación y comparación con secuencias de bancos de datos……..31
3.7 Obtención de la sonda molecular…….31
3.8 Hibridación molecular y detección - Dot blot y Slot blot……...32
3.9 Validación de las sonda molecular……...32
a) Sensibilidad de la sonda ……..32
b) Sencibilidad de la sonda sobre ADN obtenido por PCR……..32
c) Sensibilidad de la sonda sobre extracciones de material vegetal.....33
d) Especificidad de la sonda…….33
e) Repetibilidad de los resultados obtenidos…….....33

4. Resultados y Discusión……..34

4.1 Eficacia de la Inoculación de plantas en cámara…….....35
4.2 Ajuste de la técnica de RT-PCR…….……...36
4.3 Evaluación de los métodos de extracción…….……37
4.4 Transformación y Clonación de de células de *Esqueriquia coli* DH5α.....38
4.5 Secuenciación……38
4.6 Validación de la sonda..... 38
4.7 Especificidad de las sonda frente a virus analisados rutinariamente…….39
4.8 Validación de la sensiblidad de la sonda sobre tejido vegetal……...40
a) Evaluación de sensibilidad del método de extracción…….....40
b) Sensibilidad de la sonda sobre extracciones de tejido vegetal……..40
c) Ensayo de sensibilidad de la sonda en tubérculos de uso corriente……...41

4.9. Comparación de métodos de revelado. Colorimétrico versus quimiliminicente…42
4.10 Sensibilidad de la sonda viroidal sobre el producto obtenido por PCR……...42

5. Conclusiones.....44

6. Perspectivas Futuras……46

7. Referencias bibliográficas……47

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios por las oportunidades de progreso en todos los aspectos de mi vida.

Deseo expresar mi gratitud a mi tutora de tesis Ing. Agr. Gabriela Pagliano MSc. por haberme permitido ser parte de este proyecto, por sus enseñanzas y tiempo.

Agradezco al personal de MGAP; Ings. Agrs. Ana Etchevers, Silvia Méndez y Ana Pintos por permitirme trabajar junto a ellas.

A la Dra. Clara Pritsch por sus aportes al trabajo y al Dr. Jorge Pereira por sus consejos en varios aspectos.

A mi Madre y a mi Padre porque creen en mí y me apoyan en mis emprendimientos, mi profundo agradecimiento por las veces que me animaron.

A mi esposo por su amor y comprensión, por sus energías dedicadas a mi progreso y porque pude contar con él siempre.

Agradezco a Rosana, Cynthia, Susana, Marianella, Alejandra, José, Rodolfo y a todos los pasantes de la cátedra de Biotecnología por su contagiosa alegría y porque han sido parte de mi crecimiento personal.

Lista de abreviaturas

ADNc	ADN complementario
ARNm	ARN mensajero
ARNvd	ARN viroidal
ASBVd	Avocado sunblotch viroid
CITV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
CEVd	Citrus Exocortis Viroid
DGSSAA	Dirección General de Servicios Agrícolas
E. coli	Escherichia coli
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
Kb	Kilobases
Kg	Kilogramo
MGAP	Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca
µm	micrometro
µl	microlitro
nt	nucleotido
pg	picogramos
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLMVd	Peach Latent Mosaic Viroid
PSTVd	Potato Spindle Tuber Viroid
PLRV	Potato Leafroll Virus
PVX	Potato Virus X
PVY	Potato Virus Y
RT-PCR	Retrotranscription Polymerase Chain Reaction

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Resumen

El viroide del Tubérculo Ahusado de la Papa (PSTVd) es capaz de ocasionar pérdidas de rendimiento estimadas entre el 17 y 64 % en cultivares, dependiendo de la susceptivilidad de los mismos, la severidad de las cepas o variantes y las condiciones ambientales imperantes.

Al ser altamente infeccioso, se disemina fácilmente por modos mecánicos y mediante tubérculos infectados, pudiendo transmitirse además a través de la semilla botánica y polen.

Aunque se encuentra distribuido a escala mundial, el PSTVd es objeto de regulaciones cuarentenarias para diversos paises, entre ellos Uruguay, en donde no ha sido reportado. En los últimos 5 años ha ingresado al país 32.233.330 kg. de papa semilla, lo que implica la importancia de contar con un método de detección rápido y eficiente, para analisis masivo, y de este modo no permitir el ingreso de este viroide al país. La técnica de hibridación molecular fue elegida como método de detección ya que permite trabajar con grandes cantidades de material fresco o liofilizado, y por contar con personal calificado para el desarrollo de esta metodología en nuestro país. (Pagliano G., 2000).

El material vegetal infectado utilizado para este trabajo se obtuvo mediante inoculación de plantas con extractos obtenidos de tejido liofilizado enviado por la Universidad Politécnica de Valencia, España. Se lo mantuvo en cámara de crecimiento, bajo condiciones controladas, dentro de las instalaciones de los Laboratorios Biológicos del MGAP.

Se obtuvo y validó la sonda para el viroide PSTVd confirmando su sensibilidad y especificidad mediante hibridación molecular con PVX, PVY o PLRV, donde no se detectó señal alguna de reacción. Se utilizaron estos virus de papa por ser los empleados en analisis rutinarios en Laboratorios Biólogicos del MGAP.

Para cumplir con estas expectativas se ajustaron las condiciones de extracción de ARN y de RT-PCR del viroide comprobándose que todos los métodos de extracción empleados fueron eficientes (CIP, Noroña-Fonseca y Tripure) sobresaliendo el método CIP con alguna modificación, por lo que se recomienda su empleo en primer lugar y luego el de Tripure al, tener mayor practicidad además de resultar más rápido y económico. Se logró aislar el viroide, clonarlo y transformarlo obteniendo células con distintos clones. Se obtuvo sonda de ADNc marcada con digoxigenina validándose con muestras obtenidas a partir de inoculaciones de hojas y tubérculos.

El límite de sensibilidad de la técnica es de 0.22mg en tejido infectado de hoja y 3mg en tejido infectado de tubérculo. El límite de detección de la sonda de ADNc sobre ADN viroidal fue 55pg de ADN. Se determinó la especificidad de la técnica utilizando extracciones de ARN de papas infectadas con PVX, PVY y PLRV como controles negativos y plásmido de PSTVd como control positivo. Los ensayos de las membranas de hibridación se repitieron en múltiples oportunidades tanto en hoja como en tubérculo para confirmar los resultados. Los métodos de revelado por colorimetría y quimioluminiscencia fueron evaluados resultando positivo el empleo de ambos. La detección del viroide PSTVd aplicando la técnica de hibridación molecular es una métodología económica, rápida y eficaz (González- Pérez L., *et al* 2001) habiendo sido validada tanto en hojas como en tubérculos de papa y esta disponible para ser aplicada en Programas de Cuarentena Vegetal en instituciones que realicen tareas de certificación o que lo necesiten.

1. Introducción

1. Introducción

1.1 Definición de Viroides

Cuando se descubrieron los virus, los fitopatólogos pensaron que ya no existían patógenos más pequeños. Esto dió como resultado que en muchos estudios etiológicos, al no encontrar hongos, bacterias o nemátodos, se le asignara a ciertas patologías en estudio una naturaleza viral. Nuevas tecnologías como la microscopía electrónica (Figura 1) permitieron conocer la existencia de patógenos submicroscópicos como los viroides, virusoides, virus satélites y otras partículas infecciosas, en plantas. (Sänger *et al.*, 1976; Riesner *et al.*, 1979)

Los viroides se encuentran en las plantas enfermas en cantidades extremadamente pequeñas, usualmente se puede recuperar de 0.1 - 0.5 µg de partículas viroidales por gramo de tejido fresco (Sosa, 1997).

Afortunadamente, los ARN de muchos viroides son muy estables a altas temperaturas y son viables por varios años cuando se almacenan a temperatura ambiente o liofilizados Estas características hacen posible realizar las etapas de fraccionamiento y concentración de viroides a partir de extractos vegetales (Singh, 1980).

En la actualidad se sabe que los virus y viroides son dos grupos de patógenos completamente diferentes y no existen indicios de que tengan relaciones filogeneticas cercanas (Flores *et al.*, 2000).

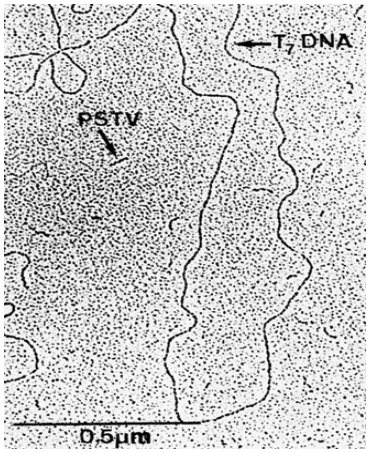

Figura 1. Microscopía electrónica en la que se muestran partículas parcialmente purificadas de viroide PSTVd y fago T7 ARN. Barra = 0.5 µm. (extraído de Sogo *et al*., 1973).

1.1.2 Genoma viroidal

El genoma de los viroides está constituido por una pequeña molécula de ARN circular de entre 250 a 400 nucleótidos que adquiere un complejo plegamiento espacial. A diferencia de los virus ARN, el genoma de los viroides no codifica ninguna proteína, por lo que son parásitos tanto de la maquinaria de traducción como de la de transcripción de las células que los hospedan (Sänger *et al*., 1976).

Hasta ahora los viroides solo han mostrado asociación con enfermedades en las plantas. Sin embargo, algunos autores sugieren que agentes similares posiblemente están asociados a enfermedades humanas (Sänger *et al*., 1976).

El único agente causante de patologías humanas que hasta el momento puede asemejarse a los viroides es el agente de la hepatitis delta que aparenta ser un intermedio entre los 'virus clásicos' y los viroides. Este agente tiene un genoma de ARN pequeño (1700pb), aunque un poco más grande que los otros viroides pero en su estructura y secuencia de ácidos nucleicos es similar a los viroides y difiere de los virus verdaderos en que no codifica su propia proteína de adhesión (Harrison T., 1994).

1.1.3 Estructura viroidal

Su naturaleza circular fue primero comprobada directamente por microscopía electrónica (Sogo *et al.*, 1973). Cuando las moléculas son sometidas a condiciones de desnaturalización, pueden verse como círculos covalentemente cerrados, aunque todas las preparaciones de viroides contienen una proporción variable de moléculas lineales (Sänger *et al*., 1976).

La estructura primaria de los viroides definida por su secuencia de nucleótidos determina sus propiedades biológicas (rango de hospederos, capacidad patogénica) y moleculares. Poseen un elevado grado de complementaridad interna (entre el 64 y el 73% de las bases, con un alto porcentaje de pares G:C) (Keese y Symons, 1985).

La aplicación de programas informáticos para el cálculo de las estructuras secundarias de mínima energía libre de los viroides ha permitido la obtención de una serie de conformaciones en forma de varilla o de cuasi-varilla (Figura 2) (Navarro y Flores, 1997).

Las regiones de apareamiento intramolecular se alternan con pequeños bucles de bases desapareadas. Existen datos experimentales que apoyan estas estructuras. En el caso del PSTVd se ha comprobado que la conformación "in vitro" obtenida por microscopía electrónica es de tipo varilla (Sogo *et al*., 1973; Sänger *et al.*, 1976).

Figura 2. Estructura secundaria de mínima energía libre propuesta para modelo tipo varilla de PSTVd. (extraído de Navarro y Flores, 1997)

1.1.4 Dominios en la molécula viroidal

En 1985, Keese y Symons propusieron un modelo que dividía la conformación de tipo varilla de todos los viroides conocidos hasta el momento, en cinco dominios estructurales. El dominio central (C) flanqueado por los dominios patogénico (P) y variable (V), quedando en los extremos de la estructura los dominios terminales derecho e izquierdo (TR y TL).

En un principio se asignó una función a cada dominio; por ejemplo, el dominio P se asoció con los efectos patogénicos del PSTVd y otros viroides estrechamente relacionados con éste. Sin embargo, datos posteriores permitieron afirmar que la situación es más compleja y que la expresión de síntomas esta controlada por determinantes discretos situados en los dominios TL, P, V y TR (Sano *et al.*, 1992).

Dentro de estos cinco dominios estructurales se han caracterizado una serie de motivos conservados. El más importante es la región CCR situada en el dominio C de la estructura secundaria en forma de varilla. Esta región está constituida por dos series de nucleótidos en las hebras superior e inferior flanqueados en el caso de la hebra superior por dos repeticiones invertidas (Diener, 1986) .

Otros motivos de secuencia son las denominadas Región Terminal Conservada (TCR, Terminal Conserved Region) (Koltunow y Rezaian, 1988) y Horquilla Terminal Conservada (TCH, Terminal Conserved Hairpin) (Putcha *et al*., 1988; Flores *et al*., 1997) (Figura 3). Su estricta conservación en secuencia y localización sugieren una importante función.

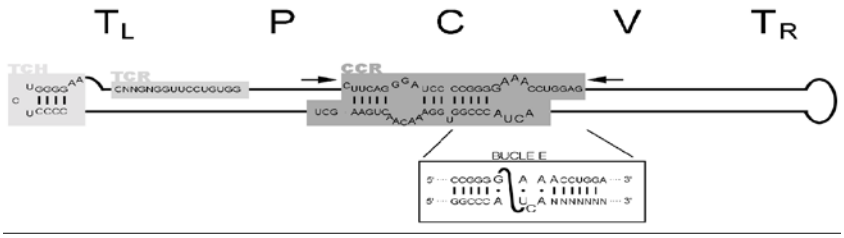

Figura 3. Representación esquemática de la estructura secundaria de tipo varilla propuesta para la mayoría de los miembros de la familia *Pospiviroidae*. En la parte superior de la figura se indica la localización de los dominios C (central), P (patogénico), V (variable) y TL y TR (terminal izquierdo y terminal derecho, respectivamente). Los nucleótidos que forman parte de las regiones conservadas CCR, TCR y TCH aparecen en cuadros grises. Las flechas que flanquean la rama superior de la CCR indican los nucleótidos que forman, junto con los estrictamente conservados, repeticiones invertidas imperfectas. En la parte inferior de la figura se muestra el denominado bucle E, elemento de estructura terciaria caracterizado en la CCR del PSTVd. Las letras N indican los nucleótidos no conservados, y las de mayor tamaño las bases características del bucle E. (Keese y Symons, 1985).

1.1.5 Clasificación de los viroides

La primera clasificación de viroides reportados y secuenciados fue realizada por Putcha et *al* (1988), que se basó en la homología de secuencia, tomando arbitrariamente como límite el 60% de homología para la separación de grupos.

Posterirmente, Koltunov y Rezaian (1989) propusieron una clasificación basada en las diferencias de secuencias de la zona conservada central y en la capacidad de autoclivaje presentada por algunos viroides. Mantuvieron el criterio de la homología de secuencias para distinguir entre distintos viroides, y razas o variantes de un mismo viroide, como lo define Keese *et al.* (1985), fijando un límite de 90% de homología para considerar como la misma especie de viroide.

El PSTVd pertenece al género *Pospiviroide* dentro de la familia *Pospiviroidae* (Putcha et *al* (1988). Fue el primer viroide secuenciado (Gross *et al.*,1978) y es el mejor caracterizado molecularmente. La secuencia de referencia tiene 359 nucleótidos (nt) y existen más de 130 variantes de secuencias (Gross *et al.*,1978; Schnoelzer *et al.*, 1985; Hammond y Owens, 1987; Lakshman y Tavantzis, 1993;Gruner *et al.*, 1995).

Compartiendo el criterio de Kotunov *et al.*(1989) realiza una primera división entre dos tipos ASBVd o Grupo A, cuyos miembros poseen la capacidad de autoclivaje pero no poseen región conservada central, y el tipo PSTVd o Grupo B, cuyos miembros poseen CCR, pero no capacidad de autoclivaje. Dentro del Grupo B se distingue al sub grupo B1 del PSTVd y al sub-grupo B2 del ASSVd que se separan por diferencias de secuencia en la región conservada central. Actualmente el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (CITV), clasifica los viroides en dos familias, *Pospiviroidae* cuya especie tipo es el PSTVd y *Avsunviroidae* cuya especie tipo es el ASBVd (Avocado Sunblotch Viroid).

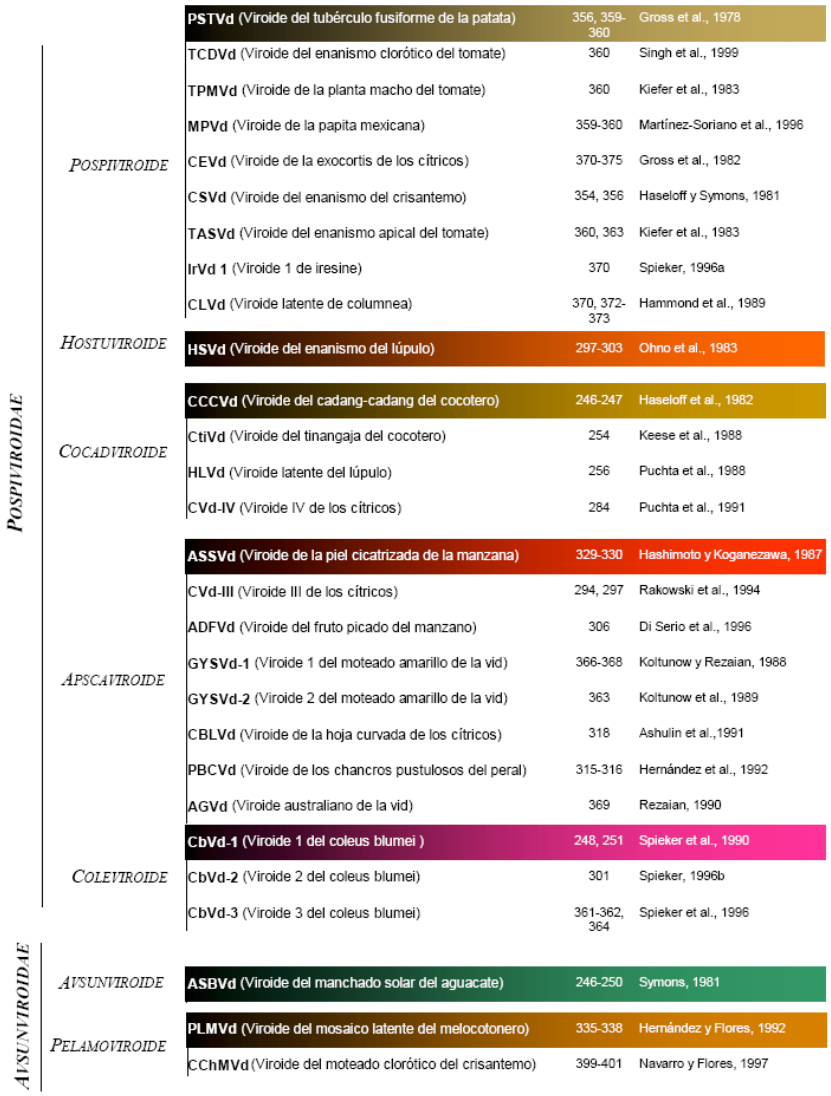

Figura 4. Clasificación de los viroides caracterizados molecularmente hasta la fecha. Éstos se agrupan en dos grandes familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, que se dividen en cinco y dos géneros respectivamente. Las especies tipo de cada género se destacan con fondo coloreado. Para cada una de las especies aparecen indicados la abreviatura junto con el nombre en castellano, el tamaño en nucleótidos y la referencia del trabajo en donde se describió. (extraído de Flores et *al.*,2000).

1.1.6 Replicación

Los viroides se replican siguiendo pautas en las que todos los intermediarios son ARNs y requieren dos tipos de componentes: los moldes que se transcriben y procesan, y las enzimas que catalizan estas reacciones. Este modelo de replicación se denomina de "círculo rodante" y está relacionado con la naturaleza circular de los viroides (Branch y Robertson, 1984).

El modelo se elaboró después de constatar la existencia de un conjunto de ARNs monoméricos y oligoméricos de polaridad negativa (Grill y Semancik, 1978; Branch *et al.*, 1981) y de ARNs oligomericos de polaridades positivas, que se encontraban en concentraciones inferiores a las del propio viroide en plantas infectadas. Estos RNAs se consideran como los intermediarios de la replicación (Bruening *et al*., 1982; Hutchins *et al*., 1985).

Dentro de este modelo se han propuesto dos alternativas denominadas "simétrica" y "asimétrica", en función del tipo de molécula que actúe como molde en la segunda parte del ciclo replicativo. La molécula monomérica más abundante se designa como de polaridad positiva y es la que actúa como molde para la síntesis de oligómeros complementarios y por tanto de polaridad negativa. Estos pueden seguir los dos caminos. En la variante asimétrica, el oligómero de polaridad negativa es el molde para la síntesis de moléculas oligoméricas de polaridad positiva, que después se procesan a monómeros lineales y son ligadas para dar las moléculas circulares maduras. La variante simétrica, se caracteriza por la presencia de monómeros circulares de polaridad negativa que se generan a partir de olígomeros que se procesan para generar monómeros circulares. Estos intermediarios circulares actúan como molde de un segundo círculo rodante para la síntesis de las moléculas de polaridad positiva (Branch *et al.*, 1988).

En plantas infectadas con PSTVd sólo se consiguió recuperar monómeros circulares de polaridad positiva, lo que hizo suponer que este viroide y los demás de la familia *Pospiviroidae* se replican siguiendo el modelo asimétrico (Branch *et al.*, 1988). En tejidos de plantas infectados con ASBVd y PLMVd, viroides de la familia *Avsunviroidae*, se detectaron monómeros circulares de polaridad negativa (Darós *et al.*, 1994). Esta información condujo a postular que los viroides de esta familia se replican por medio del modelo simétrico.

Para la replicación del tipo círculo rodante se requiere la acción de tres tipos de enzimas: una ARN polimerasa ARN dependiente que sintetice las moléculas oligoméricas, una RNasa que las procese a unidades de longitud completa y una ARN ligasa que genere los monómeros circulares maduros. Como los viroides no tienen capacidad codificante, estas actividades deben residir en la célula susceptible (Branch *et al.*, 1988).

Estudios con amanitina en distintos organismos, un péptido que inhibe la ARN polimerasa IIα, mostraron que la misma inhibía conjuntamente la transcripción y la replicación del PSTVd (Schindler y Mühlbach, 1992) y del CEVd (Flores y Semancik, 1982; Flores, 1989). Por extensión, se ha propuesto que la ARN polimerasa II es la responsable de la síntesis de oligómeros de los viroides de la familia *Pospiviroidae*, lo que es coherente con el hecho de que estos viroides se acumulen en el núcleo. El procesamiento de los oligómeros a monómeros lineares en los viroides de la familia *Pospiviroidae* probablemente se efectua por una ARNasa nuclear, ya que estos viroides no tienen capacidad de corte. Se ha propuesto la existencia de una estructura específica del oligómero del viroide que sería reconocida por la ARNasa del huésped (Tsagris *et al*., 1987 y 1991; Baumstark y Riesner, 1995; Baumstark *et al.*, 1997).

Para la producción de las moléculas circulares completas es necesaria una ARN ligasa. En el caso de la familia *Pospiviroidae* no se sabe si las actividades ARNasa y ARN ligasa se realizan por una misma enzima o en enzimas distintas (Tsagris *et al*, 1987).

Los viroides se replican en ausencia de mecanismos de prueba de lectura, lo que genera una elevada tasa de variabilidad. Así, un aislado de viroide está constituido por un número diferente de variantes de secuencias, como se ha demostrado en el caso del PSTVd (Lakshman y Tavantzis, 1992), el CEVd (Visvader y Symons, 1985) o el PLMVd (Hernández y Flores, 1992; Ambrós *et al.*, 1998), entre otros. Estas variantes individualmente pueden infectar un huésped susceptible con virulencia distinta (Visvader y Symons, 1985; Lakshman y Tavantzis, 1993).

La planta huésped ejerce una presión de selección entre las distintas variantes por lo que la manifestación de una enfermedad sería resultado de la interacción de una población heterogénea de variantes de secuencia con un huésped susceptible (Semancik *et al*., 1993).

1.1.7 Tasa de mutación e Hipótesis Evolutiva

Los viroides poseen tasas de mutación extremadamente altas debido a su escasa fidelidad replicativa. Se han realizado estudios sobre la tasa de mutación en las ribozimas de cabeza de martillo, claves para la replicación viroidal (Lakshman y Tavantzis, 1992). Estas ribozimas son estructuralmente las más simples que se conocen, conteniendo en poco mas de veinte nucleótidos la información necesaria y suficiente para actuar catalíticamente de forma específica (Navarro y Flores, 1997).

El descubrimiento de la actividad catalítica de algunos ARNs (Kruger *et al.*, 1982) es consistente con la idea de que previamente al mundo celular actual, basado en el ADN y las proteínas, pudo existir un mundo de ARN ("RNA world") en el que las moléculas que almacenaban y expresaban la información genética eran de ARN. A partir de esta idea se ha llegado a sugerir que tanto los viroides como los ARNs satélites de tipo viroidal podrían ser reliquias evolutivas de este"mundo"de RNA (Diener, 1989 y 1996). Entre los argumentos que sostienen esta hipótesis destaca la presencia en tres viroides y en todos los ARNs satélites de tipo viroidal, de ribozimas con actividad de ARNsa y en algunos casos de ARN ligasa. La simplicidad estructural de estas ribozimas sugiere que

pudieron estar implicadas en la replicación del ARN durante las etapas tempranas de la evolución de la vida en nuestro planeta.

Con posterioridad, los viroides habrían adquirido evolutivamente una dependencia del huésped y, los ARNs satélites del virus auxiliar y del huésped, convirtiéndose así en parásitos intracelulares y quedando la actividad catalítica de los mismos como un vestigio de su pasado evolutivo (Diener, 1989 y 1996).

Las primeras tasas de mutación de genomas de ARN se calcularon experimentalmente empleando el bacteriófago Qβ como sistema modelo, obteniéndose valores del orden de 10^{-4} sustituciones por nucleótido incorporado y ronda de replicación (Domingo *et al*., 1976). Las mutaciones que afectan a los nucleótidos conservados en las ribozimas interrumpen la replicación del viroide, lo que ha permitido estimar la frecuencia con la que se producen las mutaciones. Después de confirmar experimentalmente que todas las mutaciones detectadas inactivaban la ribozima, pudieron concluir que la tasa de mutación es de un error por cada 400 nucleótidos. Este valor es el más alto jamás descrito para cualquier entidad biológica, extendiendo el intervalo de tasas de mutación compatibles con la vida en más de un orden de magnitud.

Estas características los hacen similares a los replicones primitivos, que se cree existieron hace más de mil millones de años y que debieron soportar tasas de mutación extremadamente elevadas. La adquisición de mecanismos que incrementasen la fidelidad de la replicación supuso un paso decisivo en la aparición de formas de vida complejas. (Gago *et al*.,2009). Por su tamaño y simplicidad los viroides son considerados por algunos investigadores como fósiles vivientes. (Diener, 1989)

1.2 Viroide del Tubérculo Ahusado de la Papa

El viroide en estudio es de la Familia *Pospiviroidae*, Genero *Pospiviroide*. La Especie es Tubérculo ahusado de la papa, abreviado generalmente como PSTVd del inglés Potato Spindle Tuber Viroid.

1.2.1 Reseña Histórica

La enfermedad del Tubérculo Ahusado de la Papa fue descripta en 1922, pero no fue hasta finales de los años 60 que se determinó que estaba causada por un patógeno subviral. La comparación de muestras de plantas infectadas con preparaciones de virus vegetales mediante análisis de sedimentación y electroforesis mostró que contenían ARNs de bajo peso molecular. Dienner (1971) aisla el agente etiológico de la enfermedad conocida como Tubérculo Ahusado de la Papa. Casi simultáneamente, se describieron otros dos viroides, el Viroide de la Exocortis de los Cítricos [(Citrus exocortis viroid, CEVd (Semancik y Weathers, 1972)]y el Viroide del Enanismo del Crisantemo [(Chrysanthemum stunt viroid, CSVd) (Diener y Lawson, 1972)].

1.2.2 Localización subcelular

Los primeros estudios sobre la localización de los viroides se basaron en la obtención y análisis de fracciones subcelulares que permitieron asociar el PSTVd, el CEVd y el HSVd a las fracciones nucleares (Diener, 1971; Semancik *et al*., 1976; Takahashi *et al*., 1982). Investigaciones posteriores utilizando preparaciones de núcleos purificados en las que se combinó la hibridación in situ con la microscopía láser confocal de barrido, permitieron localizar el PSTVd específicamente en el nucleolo (Harders *et al*., 1989)

1.2.3 Patogénesis a nivel molecular

Los primeros estudios del efecto de patogénico viroidal sobre el huésped permitieron observar la acumulación en las plantas afectadas de varias proteínas de bajo peso molecular denominadas PRs (de "pathogenesis related") (Conejero y Semancik, 1977; Conejero *et al*., 1979).

Estas proteínas han sido el foco de atención de estudios posteriores, en donde se han caracterizado un buen número de las mismas (Vera y Conejero, 1988, 1989; Vera *et al*., 1989 y 1993) entre las que se incluyen quitinasas (García-Breijo *et al.*, 1990), glucanasas (Domingo *et al*., 1994), así como otras potencialmente implicadas en mecanismos generales de respuesta, y en algún caso de defensa, como peroxidasas, inhibidores de proteasas, proteínas relacionadas con el estrés oxidativo y proteasas del tipo subtilisina (Tornero *et al*, 1997).

En lo referido a la localización dentro de la propia molécula viroidal del determinante o determinantes responsables de la patogenicidad, estudios iniciales llevados a cabo con el PSTVd (Gross *et al*., 1981) así como con el CEVd (Visvader y Symons, 1986), mostraron que mutaciones puntuales en el dominio patogénico provocaban efectos drásticos en la patogénesis viroidal, las variantes suave y severa del PSTV difieren en tres sustituciones de nucleótidos. (Gross *et al*., 1981).

1.2.4 Distribución Geográfica

Se ha confirmado su presencia en Europa (Austria, Hungría, Polonia, Rusia, Ucrania, en Asia en general (Afghanistan, China, India), Africa (Egipto, Nigeria) y Oceanía (Australia). En América ha sido reportado en Argentina, Brasil, México, Perú, Cuba, Canadá (Alberta, British Columbia, Ontario, Québec) y Estados Unidos (Kansas, Maine, Maryland, Michigan, New cork, Wisconsin), (EPPO 2000, CABI 2000). No se ha reportado su presencia en nuestro país. (OEPP/EPPO, 1978)

1.2.5 Hospederos

El principal hospedero es la papa (*Solanum tuberosum*), pero también se ha encontrado en tomate (*Lycopersicon esculentum*), en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y berengena (*Solanum melongena*). El viroide PSTVd es el único que infecta la papa en la naturaleza. Entre 156 especies susceptibles a PSTVd, 139 son miembros de la familia *Solanaceae*. Recientemente, PSTVd ha sido encontrado en aguacates (*Persea*

amaricana) (Querci *et al*, 1995; Salazar, 1995), así como en camote (*Ipomoea batatas*) (CABI, 2000)

1.2.6 Sintomatología

Los síntomas en el follaje de la papa infectada son difíciles de reconocer. Las plantas que crecen bajo condiciones óptimas para multiplicación del viroide o que han sido durante varias generaciones, son muy pequeñas, con un crecimiento erecto (Salazar, 1995).

Los síntomas rara vez son evidentes en las plantas antes de la floración. Los tallos y los pedicelos de las inflorescencias se adelgazan, quedando más erectos y largos que lo normal. Los foliolos son ligeramente más pequeños, tienen los márgenes ondulados que tienden a curvarse hacia adentro; el ángulo entre los tallos y peciolos es más agudo. Las hojas inferiores más cercanas al suelo son visiblemente mas cortas y erectas contrastando con las hojas de plantas sanas que normalmente se apoyan contra el suelo. (Salazar, 1995).

A medida que la estación de cultivo avanza, las plantas enfermas van reduciendo su ritmo de crecimiento, haciéndose difícil su identificación debido a que se solapan con las plantas sanas de la vecindad. La variante severa causa síntomas más pronunciados tales como distorsión de los foliolos y rugosidad de la superficie de la hoja. Bajo ciertas condiciones de luz, las plantas infectadas muestran la superficie foliar más opaca y una menor reflexión de la luz (Singh y Fernow, 1980).

La presencia del viroide también se detecta en los tubérculos de plantas infectadas, como se muestra en la Figura 5. Estos son de forma alargada y presentan una parte central cilíndrica con tendencia en algunas variedades a formar extremos puntiagudos. Los síntomas del tubérculo se vuelven mas pronunciados a medida que avanza la estación en la que se cultiva, así, aquellos con epidermis regular se vuelven lisos, los que tienen la epidermis roja se tornan rosados y los de color púrpura toman una coloración lavanda claro. Los ojos (hundimientos para resguardar las yemas) son más numerosos y se presenta una disminución en su profundidad, son más notorios y más superficiales con el tejido que los rodea bien pronunciado y denticulado apareciendo a menudo manchas necróticas alrededor de las lenticelas (Singh y Fernow, 1980, Salazar, 1995, Agrios, 1991).

Con frecuencia se presentan resquebrajaduras en el tubérculo que son generalmente paralelas al eje longitudinal. En algunas variedades se presentan nudos e hinchamientos que deforman severamente el tubérculo, así mismo puede presentarse en la pulpa tejido necrótico en forma extensa (Singh y Fernow, 1980).

Cabe mencionar que no todos los tubérculos que se forman en las plantas enfermas muestran los síntomas antes descritos, así como también algunos tubérculos de plantas sanas se parecen a los tubérculos ahusados, muchas veces los síntomas pueden aparecer luego de varias generaciones. (Singh y Fernow, 1980).

Figura 5. Síntomas del viroide del tubérculo ahusado de la papa. Los tubérculos infectados se vuelven alargados y distorsionados (a la derecha y en el centro), comparados con el tubérculo sano (izquierda). Foto extraída de EPPO Gallery (http://photos.eppo.org/index.php/image/1998-pstvd0-02)

1.2.7 Efecto del ambiente

El ambiente juega un papel determinante en la severidad de los síntomas, el PSTVd solo se multiplica y se encuentra en alta concentración en los tejidos de la planta cuando está en condiciones de alta temperatura (superiores a 20 – 22°C) (Barrera, 1995).

A partir de la severidad de los síntomas que causa en papa y en tomate se pueden proponer tres variantes de PSTVd; suave, intermedia y severa. La reducción en el rendimiento depende de la variante, las condiciones del cultivo y el cultivar (Salazar, 1995).

La interacción de PSTVd con virus como el PVY puede causar enfermedades más severas, por ejemplo, síntomas necróticos severos en varios cultivares han sido observados solo cuando las plantas estaban infectadas con PSTVd y PVY o con PSTVd antes de la infección con PVY. La concentración de PVY es significativamente mayor en plantas doblemente infectadas (Salazar, 1995).

1.2.8 Diseminación

La principal forma de diseminación bajo condiciones de campo es la transmisión por contacto; ocurre en forma natural cuando las hojas de una planta infectada rozan o se ponen en contacto con las hojas de una planta sana, provocando roturas de pelos o tricomas de las hojas, por donde se produce la infección. Esta transmisión se produce también por el transito a través de los campos de personas, animales o implementos agrícolas que hayan estado en contacto con plantas infectadas. (Diener, 1971; Barrera, 1995; Salazar, 1995).

La transmisión a través de semilla o polen de papa y tomate es bien conocida (Salazar, 1995). El. PSTVd puede ser transmitido por áfidos si las fuentes del viroide también están infectadas con el virus PLRV. Se ha determinado un 100% de transmisión del viroide por el áfido *Myzus persicae* cuando el PSTVd fue adquirido de plantas de papa que estaban también infectadas con PLRV (Diener, 1971; Salazar, 1995).

La transmisión de PSTVd por el nematodo *Meloidogyne incognita* fue detectada cuando las masas de huevos del nematodo se desarrollaron en plantas infectadas. Se ha

observado que esas masas de huevos llevan el viroide sobre su cuerpo y así serven como vectores pasivos (Salazar, 1995).

La contaminación de plantas sanas transplantadas en suelo donde habían crecido plantas de papa infectadas fue observada durante la multiplicación rápida de papa en el Programa Nacional de Papa del Perú (Salazar, 1995).

La diseminación a larga distancia se lleva a cabo principalmente por el movimiento de tubérculos infectados, por lo que se recomienda usar tubérculo-semilla certificada que se sabe no se encuentran infectados con PSTVd (Singh y Fernow, 1980).

1.3 Procedimento para el diagnóstico de viroides

Los viroides, por no tener cápside proteica, no pueden ser detectados por métodos inmunológicos (Ollivier, F. 2004) y las técnicas de microscopía electrónica no son útiles, por lo que se vuelve necesario disponer de otras herramientas de diagnóstico. Los procedimientos utilizados para la detección de viroides son las pruebas biológicas y los métodos moleculares (González- Pérez L., et al 2001).

1.3.1 Detección del viroide del tubérculo ahsado de la papa

Como los síntomas foliares son difíciles de detectar y en muchas variedades el tubérculo no adopta la forma ahusada característica (Singh y Fernow, 1980, Salazar, 1995, Agrios, 1991), la detección del PSTVd ha requerido de diferentes técnicas.

Las pruebas biológicas realizadas son la prueba normal del tomate (Raymer *et al*., 1964), la prueba de Yang y Hooker (Yang y Hooker, 1977) y la prueba de confrontación (Fernow, 1967).

Los métodos moleculares utilizados son la electroforesis en gel de acrilamida y poliacrilamida (PAGE), el diagnóstico por amplificaciones vía PCR y la hibridación de ácidos nucléicos NASH (Nucleic Acid Spot Hybridization).

1.3.2 Pruebas Biológicas

Prueba normal del tomate

El tejido de la planta analizado se macera en agua destilada y luego se inocula mecánicamente a plantas jóvenes de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Rutgers). Las plantas inoculadas se colocan en una cámara de crecimiento a 30ºC hasta que aparezcan los síntomas característicos de las plantas infectadas que son: epinastia, rugosidad y enrollamiento foliar, necrosis de venas y enanismo. Con el tiempo la necrosis de las venas se extiende a toda la hoja y esta adquiere una coloración café. Las cepas severas de PSTVd provocan síntomas muy claros, en tanto que las leves son difíciles de detectar, ya que los síntomas son débiles y las plantas infectadas no se distinguen con claridad de los testigos sanos (Raymer *et al*., 1964).

Prueba de Yang y Hookar

Esta prueba se efectúa de forma similar a la anterior, pero es más sensible puesto que detecta tanto la cepa severa como la débil. Las plantas de tomate inoculadas se mantienen en cámara de crecimiento a 24-30 ºC bajo iluminación fluorescente continua. Aquellas plantas infectadas con cualquiera de las cepas muestran albinismo, pero en el caso de las severas, muestran también necrosis de venas (Yang y Hooker, 1977)

Prueba de confrontación

Es una modificación de la prueba normal del tomate que se hace con el propósito de detectar las cepas débiles de PSTVd . Se utilizan tres plantas de tomate (A,B y C) en cada prueba. Primero se inoculan las dos primeras con savia de la planta de papa que va a ser sometida a la prueba; si dichas plantas muestran síntomas severos de PSTVd, entonces la planta de papa está infectada con la cepa severa del viroide. Si no muestran ningún síntoma, se inoculan las plantas B y C con la cepa severa de PSTVd y se mantienen a 30ºC. Luego de 2-3 semanas se observan los síntomas de las tres plantas (A, B y C). Si la planta C muestra los síntomas severos de PSTVd, y la planta B también los muestra, entonces la planta original no estaba infectada por el viroide; pero si la planta B no muestra síntomas, entonces la planta onginal estaba infectada con la cepa débil de PSTVd, que evitó que la planta B se infectara con la cepa severa del viroide debido a una protección cruzada. (Fernow, 1967).

1.3.3 Métodos Moleculares

Electroforesis en gel de acrilamida y poliacrilamida (PAGE).

Para la detección de ácidos nucleicos se recurrió a la electroforesis en geles cilíndricos de poliacrilamida. Posteriormente se utilizaron geles laminares que permitieron el análisis de mayor cantidad de muestras. Otros aspectos técnicos que se optimizaron fueron las técnicas de tinción, empleándose la de bromuro de etidio que permite la detección de hasta un nanogramo de ARNvd, o la de nitrato de plata que resultó diez veces más sensible (Igloi, G.L., 1983).

El desarrollo de la electroforesis bi-dimensional (Schumacher, J *et al*. 1983) y la secuencial, basada en una primera separación de los ARNvd en geles nativos de acrilamida, y su desnaturalización posterior en gel de urea, (Semancik, *et al*., 1984) pemitieron no solo la detección de pequeñas cantidades de ácidos nucleicos, sino también la separación de diferentes viroides, a partir de las diferencias en la movilidad relativa en la matriz del gel, de su molécula circular, al ser desnaturalizada. Todos estos avances aplicados conjuntamente han permitido la aplicación de la electroforesis para detección rutinaria de viroides, en varios programas de certificación sanitaria de plantas.

Aunque se destaca su utilidad, en la detección de ARN aún no caracterizados, la mayor limitante de esta técnica es la dificultad para analizar gran número de muestras (González- Pérez L., *et al* 2001)

Diagnóstico por amplificaciones vía PCR

La determinación de la secuencia de la mayoría de los ARN de los viroides conocidos posibilitó el diseño y la síntesis de cebadores específicos para la amplificación vía PCR (Polymerase Chain Reaaction) de muchos de ellos tanto con fines de diagnóstico como para posteriores estudios moleculares.

Como se indica anteriormente se reportó que la replicación de los viroides no involucra síntesis de intermediarios de ADN y no existen secuencias similares a las de los viroides en el ADN nuclear del hospedero. Esto hace, por un lado necesario la transcripción reversa de los ARNvd con cebadores específicos, y por otro la especificidad del producto obtenido. Los viroides presentan una zona central conservada, que posibilita diferenciarlos de otros viroides. El diseño de cebadores con secuencias pertenecientes a esta región permite la amplificación de cada viroide en forma específica y la posibilidad de detectarlos aunque se trate de variantes de un mismo viroide (Weidemann y Buchta, 1998).

Diagnóstico basado en hibridación molecular

El fundamento de la técnica de hibridación molecular está basado en la capacidad que tienen los ácidos nucleicos de desnaturalizarse y volver a unirse con nucleótidos complementarios. Esto se realiza bajo condiciones de temperauras elevedas o cualquier otro método desnaturalizante que provoque roturas en los puentes de hidrógeno en las hélices y el posterior enfriamiento que permite la reasociación de hebras de nucleótidos complementarios. Si durante este proceso se encuentran presentes moléculas de ácidos nucleicos complementarias, tanto de ADN como de ARN llamadas “sondas” se forman puentes de hidrógeno entre las moléculas de nucleótidos y las sondas empleadas.

A partir de las sondas se puede reconocer la presencia de secuencias que se desean identificar, ya que se unirán a ellas y se detectarán mediante métodos de marcaje radiactivos, colorimétricos y/o luminescentes. Cuando se dispone de secuencias clonadas (identificadas y copiadas previamente), la síntesis de sondas puede llevarse a cabo mediante la técnica de PCR utilizando cebadores específicos. En el caso que haya un gran número de muestras para analizar, las técnicas de hibridación molecular son muy eficientes (Derrick *et al*., 2003).

1.4 Importancia Económica

El viroide del tubérculo ahusado de la papa produce en muchas regiones pérdidas graves ya que es una de las enfermedades más destructivas del cultivo; disminuyendo la producción, con frecuencia hasta en un 25% o más (Agrios, 1991).

Las variantes (“strains”) leves que producen síntomas poco conspicuos predominan sobre las “strains” severos en proporción de 10 a 1 y causan pérdidas entre 15 y 25%, mientras que los “strains” severos causan síntomas evidentes que producen hasta 65% de pérdidas (Singh y Fernow, 1980; Salazar, 1995).

El viroide es considerado de alta importancia en programas de cuarentena y es un problema para programas de mejoramiento y propagación de papa semilla. Bajo condiciones de campo, el PSTVd puede reducir los rendimientos en forma considerable; en China una reducción en rendimiento de hasta de 80% de algunos cultivares fue atribuida a PSTVd (Salazar, 1995).

1.5 Control

El manejo de esta enfermedad es solo cultural, en donde principalmente se recomienda el uso de semilla certificada; además de sembrar solo en campos libres de tubérculos enfermos que pudieran haber sobrevivido de la cosecha anterior.

Otros métodos de prevención son a) evitar la transmisión mecánica, plantando solo tubérculos enteros en lugar de semilla cortada y evitar el contacto con el follaje por el equipo de labranza; b) desinfección de herramientas con hipoclorito de sodio o compuestos de amonio cuaternario; c) remoción de plantas enfermas enteras (aunque esto no es muy efectivo por lo impreciso de los síntomas) y d) control de insectos (Schaupmeyer, 1992; Singh y Fernow, 1980; Agrios, 1991).

1.6 Situación en Uruguay

Aunque se ha detectado en regiones de todo el mundo, el PSTVd es objeto de regulaciones cuarentenarias, en diversos paises, entre ellos Uruguay en donde no ha sido reportado (OEPP/EPPO, 1978).

Las importaciones de papa de nuestro país, provienen de paises donde se ha reportado O NO SE HA REPORTADO? la presencia de PSTVd. Según la Cámara Mercantil de Productos del País la intención de compra de semilla importada para la siembra de la próxima zafra (otoño 2011) fue estimada en 2.783 toneladas, cifra ligeramente superior a la de otoño 2010 (2.569 toneladas).
http://www.camaramercantil.com.uy/docs/boletines/baf876dfb497535072af42caa7035c41.pdf

Para prevenir la introducción de esta enfermedad a través del intercambio de germoplasma y la importación de semilla botánica o comercial, se hace necesario disponer de técnicas de diagnóstico que faciliten la detección rápida y eficiente del viroide (González-Pérez L., *et al* 2001)

2.Objetivos

2.1. OBJETIVOS

2.1. General

Optimizar las técnicas moleculares de diagnóstico para el viroide ahusado de la papa, mediante hibridación molecular con el propósito de contar con un método de diagnóstico sensible y de aplicación masiva, como modo de apoyo a los Programas de Cuarentena Vegetal mejorando el nivel de seguridad y el mantenimiento del Estatus Fitosanitario actual de nuestro país.

2.2. Específicos

Aislar el Viroide del Tubérculo Ahusado de la papa (PSTVd), y evaluar el mejor método de extracción.

Obtener material biológico infectado con el viroide con el fin de estudiar su sintomatología y ajustar las condiciones técncas para su detección.

Ajustar las condiciones técnicas de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa para la producción de una sonda de ADN con fines de diagnóstico por hibridación molecular.

Obtener una sonda de ADNc específica del PSTVd para su detección.

Optimizar el diagnóstico del viroide mediante la determinación de especificidad, sensibilidad, y repetibilidad de la técnica de hibridación molecular para su utilización en análisis masivos.

3. Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Material vegetal utilizado para la replicación del viroide

a) Condiciones de crecimiento

Se utilizaron distintas variedades de papa, suministradas por el Ing. Agr. Luis Aldabe del Departamento de Producción Vegetal de Facutad de Agronomía, y se sembraron en tierra autoclavada y depositadas en cámara de crecimiento. Las variedades fueran: Chieftain, Red Pontiac y Kennebec, siendo estas algunas de las más utilizadas en nuestro país como semilla. También se sembraron tomates de la variedad Rutgers como planta indicadora.

Las condiciones de crecimiento fueron 16 horas de luz y temperatura mantenida entre 25 y 35ºC. La elección de esta temperatura se basó en las condiciones descriptas como óptimas para la replicación de los viroides. (Barrera, 1995).

El material utilizado para inocular las muestras de papa adultas, fue tejido liofilizado de tomate infectado con el viroide PSTVd proporcionado por la Universidad Politécnica de Valencia, España.

b) Inoculación de plantas en cámara

La inoculaión de plantas se realizó con el material liofilizado, previamente hidratado con agua mili-Q para restaurar su peso original,y posteriormente colocadas en cámara de crecimiento por aproximadamente un mes.

Se siguieron los procedimientos para inocular descriptos en el Manual de Técnicas en Virología de Plantas del CIP (Jayasinghe, U.; Salazar, L. F. ,1993).

Luego de homogeneizar el tejido infectado con Buffer Fosfato, 0.01 Molar (Na2HPO4-KH2PO4) pH 7,4 en proporción 1:1 (peso en hoja en gr/ml buffer) se realizaron distintos procedimientos de inoculación para obtener controles positivos y negativos. Primeramente se tomaron 4 plantas de cada variedad a los 30 días de sembradas y se realizaron los siguientes procedimientos:

b.1-*Inoculación mecánica con carborundum* (C+).
Al tejido hidratado se lo maceró y mezcló con cantidad suficiente de carborundum (previamiente ensayada en los laboratorios de MGAP), para crear un preparado con el que se frotaron las hojas de las plantas de la cámara para la inoculación del viroide. También se inocularon plantas unicamente con carborundum y agua mili-Q como control negativo del procedimiento (C-).

b.2-*Inoculación con jeringa* (J+).
Al material liofilizado hidratado se lo maceró con Buffer Fosfato (Manual de Técnicas de Virología CIP, 1993). Luego se inocularon los tallos de las plantas de cámara, con esta mezcla utilizando una jeringa. Además de las plantas de papa también se inocularon

por este medio tomates Rutger (semillas proporcionadas por la Universidad Politécnica de Valencia, España) que se utilizó como planta indicadora. Para los controles negativos de este procedimiento (J-) se inocularon plantas de cámara sólo con Buffer Fosfato.

b.3- *Inoculación con jeringa y carborundum* (C+ J+).
Se realizó una inoculación combinanado ambas técnicas anteriores, para aumentar la probabilidad de infección. Se inoculó conjuntamente tallo con jeringa y hojas con carborundum. Se realizaron sus correspondientes controles negativos (C- J-).

b.4- *Inoculación de tuberculos con jeringa* (T, J+).
Contando con más tubérculos de las variedades mencionadas, a los 30 días de la primera inoculación se realizó una nueva siembra inoculando los tubérculos antes de plantarlos, con tejido liofilizado hidratado y Buffer Fosfato, utilizando jeringa, con su correspondiente control negativo (T, J-).

A los 20 días luego de la inoculación se realizaron extracciones de ARN de hojas de las plantas crecidas en cámara con el fin de dar tiempo al desarrollo vegetal y a la replicación del viroide (ver punto 3.2).

3.2 Extracciones de ARN viroidal

La búsqueda y selección de los métodos de diagnóstico, estuvo orientada a encontrar aquellos que fueran más prácticos a la hora de realizar un análisis masivo de material vegetal para el viroide del tubérculo ahusado de la papa y que a su vez incrementara la especificidad y repetibilidad de los resultados.

Con esta finalidad se realizaron ensayos a partir de tejido infectado liofilizado y plantas inoculadas con el viroide en estudio, aplicando distintos métodos de extracción de ARN. Se realiaron extracciones con a) Tripure Isolation Regeant Kit (https://www.roche-applied-science.com), b) con la metodología descripta por R Flores (Astruc, 1996), c) la descripta por Fonseca (Astruc, 1996) y d) la metodología CIP (Jayasinghe, U. y Salazar, L. F., 1993). Entre todos estos métodos se seleccionó el que permitiera la mejor extracción de ARN.

a) Extracción de ARN con la metodología Tripure Isolation Regeant Kit
(https://www.roche-applied-science.com)

Para la extracción se procedió de dos maneras, dependiendo de si el material vegetal del que se partía era fresco, procedente de la cámara de creciminto de MGAP o infectado liofilizado. En el caso de muestras frescas, en la primera instancia del relevamiento donde solo se utilizaron las hojas, se pesaron 0.05 gramos de éstas. Se colectaron muestras de varias zonas de la planta. Las hojas provenian de todos los individuos inoculados que presentaran o no sintomatología. También se colectaron hojas de individuos sanos para control negativo.

Al material liofilizado hidratado luego de 15minutos a temperatura ambiente se le proporcionaba el mismo tratamiento que al material fresco. Las extracciones se

realizaron según Tripure Isolation Reagent kit. Tanto tejido fresco como liofilizado se maceraron en 1 ml de Tripure, se les trató con cloroformo 0,2ml/ ml de Tripure y 0.5 ml de isopropanol . La fracción soluble se concentró por precipitación en 75 % de etanol, se resuspendió en 50ml de agua MQ y se guardó a -20ºC.

b) Extracción de ácidos nucleicos según protocolo de R Flores (Astruc, 1996).

La extracción de ARN, se efectuó partiendo de 50mg. de tejido. Se maceró la muestra con 5ml de buffer de extracción (0.1M Tris-HCL, pH 9; 10mM EDTA; 0.1M NaCl; 0.1M 2-MCE; 5M urea) manteniéndolo a baja temperatura en una cámara de hielo. Luego se homogeneizó mediante el uso de un vortex por 1minuto, se centrifugó a 8000 rpm. Se dispensó el sobrenadante en tres tubos en alícuotas de 600µl y se agregó 300µl de fenol/cloroformo 1:1. Se homogeneizó nuevamente mediante vortex y se centrifugó a 14000 rpm. Se recogieron 500 uL de la fase acuosa y se le añadió 50µl de acetato de sodio 3M, pH 5.5 y 500µl de isopropanol, manteniendolos por 10min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14000 rpm por 15min. Luego se lavó el pellet con etanol 75%. Se descartó el etanol y se resuspendió el pellet en 50µl solución (10mM Tris, pH 9; 1mM EDTA; 98% formamida) y se almacenó a -20ºC.

c) Extracción de ácidos nucleicos según protocolo de Fonseca (Astruc, 1996).

Se utillizó el tejido liofilizado de planta de tomate infectada, hidratado para utilizar 0.3 gramos. de tejido vegetal. Se le agregó 300µl de SSC 10X y 300µl de formaldehído 20%. Se calentó a 65ºC por 15min y se centrifugó por 1minuto a 10000 rpm. Se obtuvo aproximadamente 300µL de sobrenadante que se almacenó a -20ºC

d) Extracción de ácidos nucleicos por metodología CIP (Manual de Técnicas de Virología, CIP, 1993)

Además de evaluar este método con el tejido de tomate liofilizado infectado con el viroide se utilizó el material fresco inoculado en cámara. Esta modificación al protocolo se realizó para hacerlo más práctico, con volúmenes de tejido y soluciones reducidos. La extracción se realizó según el protocolo del Manual de Técnicas de Virología (CIP, 1993). Se pesaron 0,2 gramos. de tejido fresco de papa, en vez de 2 gr como lo indica la técnica y se homogeneizó con Buffer de extracción (SSC10X y Formaldehído 37%). Se les adicionó ½ vol. de fenol, (no fenol saturado como lo indica la técnica) y ½ vol de cloroformo. Las extracciones se centrifugaron durante 10min a 12000rpm a 4ºC. Se obtuvo un volumen total de sobrenadante de 200µl.

3.3 Transcripción reversa (RT) y amplificación por PCR

Con los extractos así obtenidos se realizó el una reacción de retrotranscripción (RT-PCR) utilizando un par de cebadores específicos correspondientes a la región conservada central de la molécula del viroide.

Los cebadores fueron sintetizados por Alpha DNA. Las condiciones para la transcripción reversa y el diseño de los cebadores se realizaron de acuerdo a lo descripto por EPPO (Weidemann y Buchta, 1998).

Cebador 1 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG- 3'
(Secuencia complementaria al ARNvd)

Síntesis de primera cadena

Se trabajó con las extracciones mencionadas anteriormente, tomando 5µl de las mismas en forma pura, y 5µl de las diluciones 1/2, 1/5 y 1/10, utilizando agua mili-Q para este procedimiento con el fin de evitar posibles inhibidores de la reaccion de transcripción reversa.

Primeramente se colocó 5µl del cebador complementario (4 µM) y un volumen de 5µl de muestra, luego se centrifugó y se le incubó a 90ºC en el termociclador por 5 minutos. Se centrifugó nuevamente y se colocó en hielo.

Se agregaron 0.5µl RNasin 40 U/µl (PROMEGA™), 4µl tampón transcriptasa reversa 5X (PROMEGA ™), 0.8µl dNTPs 25mM, 0.8µl de transcriptasa reversa Moloney Murine Leukaemia Virus (M-MuLV) 200 U/µl (PROMEGA™), 2µl de DTT 0.1M y 1.9µl de agua mili-Q

Las condiciones para la retrotranscripcion fueron las siguientes: la mezcla detallada anteriormente se incubó a 50ºC durante 60 minutos., y a 95ºC por 10 minutos utilizando termociclador. Se homogeneizó mediante vortex y se colocó en hielo. Lo que no se utilizaba en el momento se almacenaba a -20ºC para ensayos futuros.

Amplificación por PCR

La reacción de amplificación se realizó en termociclador Quatro TC40, en tubos de 0,1ml. Se utilizó el mismo cebador de la transcripción reversa, complementario a la secuencia del viroide y otro cebador, con secuencia homóloga a región central de la molécula del viroide.

Cebador 2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C 3'
(Secuencia homóloga al ARNVd)

La mezcla de amplificación fue la siguiente:

Tampón Taq polimerasa 10X..... 2.2 µl
$MgCl_2$ (25 mm).....1.32 µl
Cebador 1. 20 µM.....2 µl
Cebador 2. 20 µM:.....2 µl
dNTPs 1 mM.....4.4µl
Agua mili-Q.....9.57 µl
Taq polimerasa (PROMEGA)1,5 U.....0.11 µl
Templado (producto de RT-PCR).....2.2 µl

Se pre calentó el termociclador a 95ºC para lograr una mejor desnaturalización de la molécula y la reacción se sometió a 40 ciclos de la siguiente secuencia de temperaturas y tiempos:

94ºC - 30 segundos.
62ºC - 60 segundos.
72ºC - 30 segundos.
y un paso final de 10 minutos a 72ºC para la elongación total de las cadenas.

Los productos de amplificación de la reacción de PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa 2%, tampón TAE 1X a 70 voltios durante una hora.. Se analizaron 6µl de cada reacción. Para el observar el tamaño del fragmento amplificado se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100pb (PROMEGA).

Luego de la migración el gel fue teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV. Un vez visualizados los productos de amplificación vía PCR se eluyó la banda de aproximadamente 360 pb con el kit de Invitrogen S.N.A.P.™ (tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/snapgel-man.pdf)

3.4 Clonado del fragmento amplificado.

El fragmento obtenido vía PCR y eluído del gel de electroforesis fue clonado, utilizándose como vector el plásmido pGem® (vector-T) de Promega

Ligación.- La reacción de ligación del fragmento a clonar con el vector, se realizó según el protocolo descripto por Sambrook *et al.* (1989). Se empleó un volumen de 10µl en tampón de ligación y se incubó utilizando el termociclador a 16ºC toda la noche, con 2U de ligasa.

3.5 Transformación y selección de colonias recombinantes

Con el plásmido conteniendo el inserto con ADN viroidal se trasformaron células de la cepa DH5α de *E.coli.* La transformación se realizó según el protocolo descripto por Sambrook *et al.* (1989), y la selección de colonias transformadas se realizó por el método convencional de α complementación que se describe a continuación.

La suspensión de células en medio LB líquido (bactopeptona 1%, extracto de levadura 0,5% y NaCl 1%) se colocó sobre placas de LB agar, a las que se les había agregado previamente 100 µL de ampicilina 10 mg/ml, para la selección de colonias transformadas y 60µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-galactopiranósido (X-gal) al 2% en dimetilformamida, y 14µl de B-D-tiogalactópiranósido (IPTG) 100nM, para la selección de plásmidos recombinantes.

Se realizó una purificación de plámidos utilizando minicolumnas Wizard Miniprep de PROMEGA ™. El producto de la purificación fue sometido a electroforesis en gel de agarosa 1% durante 1 hora a 70 voltios, con un marcador de peso molecular de 1000 pb (PROMEGA). De esta manera se visualizaron y seleccionaron los clones portadores del inserto del tamaño esperado.

3.6 Secuenciación y comparación con secuencias de bancos de datos

El plásmido conteniendo el inserto con ADN viroidal fue secuenciado en las dos direcciones forward y reverse con secuenciador automático 3730xl/DNA Analyzers en Applied Biosystems. Posteriormente se le realizó un análisis comparativo de nucleótidos e identidad de secuencias con el programa BLASTN 2.2.22 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando el algoritmo "Blasón" del servidor NCBI (Altschul *et al*., 1990).

3.7 Obtención de la sonda molecular

Para la obtención de una sonda del viroide PSTVd se utilizó el ADNc producto de la retrotranscripción (RT). Se obtuvieron sondas de ADN mediante la incorporación de digoxigenina dig-UTP (Boerhinger Mannheim), vía PCR. Los ciclos y tiempos de reacción son los descriptos en el punto 3.3. La concentración de la sonda obtenida de ADNc del viroide fue medida por espectrofotometría.

ADNc.....2 µl
agua.....5.7 µl
dCTP (1 mM).....5 µl
dGTP (1mM).....….....5 µl
dATP (1 mM).....5 µl
dTTP (1 mM).....3.25 µl
dig-UTP……1.75 µl
Tampón Taq polimerasa 10X..... .2,5 µl
Cebador 1.....1.25 µl
Cebador 2……..……....1.25 µl
Taq polimerasa (PROMEGA)1,5 U ... .0.3 µl

3.8 Hibridación molecular y detección mediante Dot blot y Slot blot

Para la hibridación molecular se emplearon membranas de nylon cargadas positivamente (Boheringer Mannheim) para inmovilizar los acidos nucléicos,

sumergidas previamente en SSC 10X y secadas en horno de hibridación. Luego de la siembra (que se realiza cargando la extracción con micropipeta sobre la menbrana) se secaron nuevamente de la misma manera y se fijaron con UV durante 15 minutos. (de Blas, 1996)

La prehibridación (42°C durante 2 horas) y la hibridación (60°C toda la noche) de la membrana con los ácidos nucléicos inmovilizados, se realizó en una solución al 50% de formamida, tampón 5X SSC (150mM NaCl; 15 mM citrato de sodio; pH 7.0) conteniendo 0.02% SDS, 0.1% N-laurylsarcosina, 2% de Solución de Bloqueo (w/w) (Roche™) (Murcia *et al.*, 2009) y en tubos de hibridación colocados en un horno Hybaid Shake 'n' Stack (Thermo Scientific).

Antes del proceso de hibridación, la sonda marcada con digoxigenina fue desnaturalizada durante 5 minutos a 95°C en termociclador e inmediatamente colocada en hielo para evitar la renaturalización. Para estimar los microlitros de sonda necesarios para cada membrana se utiliza la formula propuesta por Palacio *et al.*, (1999).

[DIG-sonda] x μL de sonda/cm^2 de membrana = 25ng/cm^2.

Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas dos veces en 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 15 minutos y luego incubadas a 60°C durante 1 hora en una solución de 0.1X SSC, 0.1% SDS en un horno Hybaid Shake 'n' Stack (Thermo Scientific). La detección inmunológica se realizó a temperatura ambiente con dos lavados de tampón de lavado, durante 5 minutos (1X de ácido maleico, 0,3% de Tween 20). Las membranas se incubaron durante 30 minutos en solución de bloqueo (Tampón de lavado 1X de ácido maleico; agente bloqueante 1X). Los ácidos nucleicos (ARN) marcados con digoxigenina fueron detectados colocando las membranas durante 30 minutos. con anti-digogixenina-fosfatasa alcalina (Fab fragments) visualizados mediante revelado radiográfico, con el sustrato quimioluminiscente CSPD, luego de incubarse las membranas durante 30 minutos sin luz a temperatura ambiente.

3.9 Validación de la sonda molecular

a) Sensibilidad de las sonda

Para evaluar la sensibilidad de las sonda se realizó un dot blot con diluciones seriadas de ADN obtenido luego de la fabricación de sonda [entonces es ADNc y de extracciones realizadas de tejido vegetal obtenidos en de la cámara de crecimiento (hojas y tubérculos)].

b) Sensibilidad de la sonda sobre ADN obtenido por PCR.

Se realizaron diluciones del ADNc de sonda con agua MQ. Las diluciones fueron: 1/10-1/100-1/500-1/1000-1/3000-1/9000-1/12000-1/15000.

c) Validacion de la sensibilidad de la sonda sobre extracciones de material vegetal

A partir de las extracciones de tejido vegetal de la cámara de crecimiento, se realizaron diluciones, con el fin de determinar la sensibilidad y mejor método de extracción. Las diluciones fueron: 1/2-1/5-1/10-1/50-1/100-1/150, con los métodos Tripure, CIP y Flores.

d) Especificidad de la sonda

Para evaluar la especificidad de la sonda se sembró como control positivo el viroide en estudio PSTVd y como controles negativos virus analizados rutinariamente en MGAP (PVX, PVY y PLRV), que son motivo de controles sanitarios.

e) Repetibilidad de los resultados obtenidos

Se repitieron varias veces todos los ensayos de manera de asegurar que se obtenían los mismos resultados bajo las mismas condiciones.

4. Resultados y Discusión

4. Resultados y Discusión

4.1 Eficacia de la Inoculación de plantas en cámara

Para saber si la inoculación fue eficaz, se realizaron extracciones de ácidos nucleicos utilizando el métoto Tripure de Roche en tejido liofilizado, utilizado como control positivo y tejido de la cámara. Se observó la presencia de sintomatología característica de PSTVd en los individuos inoculados, tales como el crecimiento erecto de los tallos en papa, la coloración grisásea de algunas hojas y el enanismo en las plantas de tomate (Figuras 6 y 7.)

La variedad más susceptible a la infección resultó ser “Chieftain” y la mejor vía para obtener tejido infectado fue inocular los tubérculos con jeringa, ya que estos presentaron la sintomatología del viroide y dieron resultados positivos a la presencia del patógeno en los distintos estudios realizados para este fin que se mencionarán posteriormente.

Por los otros medios de inoculación solo se obtuvieron resultados positivos cuando se inoculó al mismo tiempo con jeringa y carborundum.

Figura 6. Plantas de papa en cámara de DGSA, inoculadas en tubérculo con PSTVd.

Figura 7. Plantas de tomate Rutger, utilizadas como plantas indicadoras, cámara de DGSA

La primera extracción que se realizó a los 20 días de inoculación de tejido sin ser en tubérculo, no mostró señal de infección.

La segunda extracción a los 40 días de la primera inoculación, y a los 20 días de la inoculación en tubérculo resultaron positivas a la infección con PSTVd en individuos

inoculados en tubérculo y con jeringa y carborundum (J+C+) en las variedades Chieftain y Kennebec respectivamente.

Los ensayos para determinar la eficacia de las diferentes vías de infección, mostraron que la inoculación de los tubérculos antes de sembrarlos o inocular tallo y hojas de las plantas crecidas en cámara con jeringa y carborundum respectivamente, fueron las que presentaron mejores resultados si se esperaba 40 días para efectuar el análisis.

4.2 Ajuste de la técnica de RT-PCR.

Los ensayos de RT-PCR efectuados sobre diferentes ARN blanco para obtener y detectar el genoma completo del viroide PSTVd fueron ajustados y validados para los distintos métodos. Por la gran sensibilidad de las enzimas; retro transcriptasa y polimerasa éstas se ven fuertemente inhibidas por sustancias presentes en las muestras debido a las sustancias utilizadas para extracción de ácidos nucléicos por lo que unicamente se logro amplificar por RT-PCR con el método de Tripure ya que éste es el que proporionó un pellet mas libre de impurezas, siendo necesario en algunas oportunidades diluir la extracción con agua MQ para que las enzimas no se inhibieran aún con este método (Figura 8). Esto también es una de las ventajas de utilizar hibridación molecular para diagnósticar patógenos. En varias oportunidades la extracción con Tripure de un individuo inoculado, no aplificaba por RT-PCR, o se necesitaba diluirla a distintas concentraciones para lograr su amplificación, sin embargo en la membrana siempre se observaba señal positiva.

La concentración de las sustancias inhibitorias varía en cada extracción y en cada individuo analizado, por lo que para cada extracción se realizó la prueba con la extracción sin diluir, y las diluciones 1/2, 1/5 y 1/10 (Figura 8)

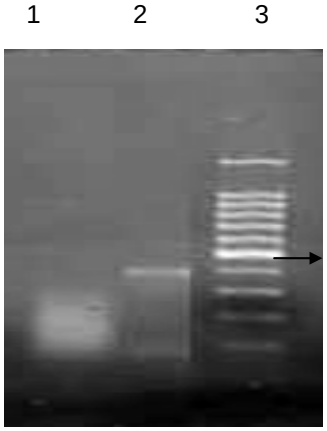

Figura.8. Gel de agarosa 1,7 %, teñido con bromuro de etidio. Las muestras corresponden a ADN viroidal obtenido por la técnica de RT-PCR. En el carril 1 se observa la amplificación ARN sin diluir, en el 2 se observa la dilución 1/5 de ARN y en el 3 un marcador de peso molecular de 100pb.

En el carril 2 del gel de la Figura 8, se observa una buena amplificación mediante RT-PCR correspondiente al viroide PSTVd del tamaño esperado 359 pb cuando se utilizó

una dilución 1/5 de la exración original. En la extracción sin diluir (carril 1 Figura 8) no se observó amplificación.
Se detectó el viroide en las inoculaciones realizadas con jeringa y carborundum en papas Kennebec y en inoculaciones en tubérculo de papa Chieftain.

4.3 Evaluación de los métodos de extracción.

Se probaron y compararon los métodos de extracción de ARN de Flores, Fonseca, Tripure y CIP modificando algunos pasos. En las extracciones realizadas con todos los métodos se observó señal en las membranas de hibridación (Figuras 9 y 13). La Figura 9 compara el método CIP (partiendo de 200mg de tejido fresco) y el de Tripure (partiendo de 50mg de tejido fresco) inoculado en tallo y tubérculo, cuando se siembran 10 *u*L de extracción. Se aprecian similares intensidades en ambos métodos.

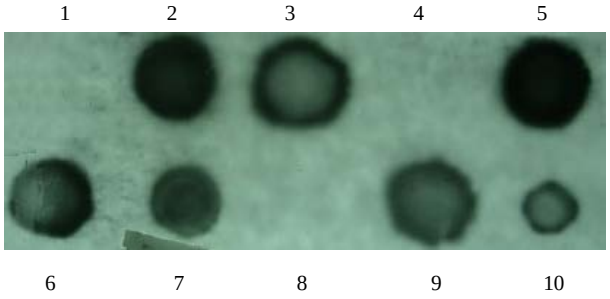

Figura. 9
Muestras 1 a 6 método con Tripure
Muestras 7 a 10 método de CIP
1-control negativo
2- control positivo Chieftain (inoc.tubérculo)
3- Chieftain (inoc.tallo)
4-Chieftain (inoc.tallo)
5-Chieftain(inoc.tubérculo)
6- tomate liofolizado
7-Chieftain (inoc.tubérculo)
8-Chieftain (inoc.tallo)
9-tomate liofilizado
10- Chieftain (inoc.tubérculo)

A partir de estos resultados se recomienda en primer lugar la aplicación de la metodología CIP y en segundo lugar la del Tripure. El método CIP es más práctico y económico ajustandose a los fines de análisis masivos.

4.4 Transformación y Clonación de células de *E.coli* DH5α

En la Figura 10 se observa el resultado obtenido luego del tratamiento realizado a las células, y la posterior purificación de ADN. En las células que incorporaron el viroide PSTVd se visualiza en gel de agarosa (0,7% , con buffer TAE 1X, durante 1 hora a 60 voltios) la presencia de una banda a la altura del plásmido pGEM utilizado. Esta banda está situada a la altura esperada, con un tamaño aproximado de 1500pb. Se guardaron células conteniendo plásmido con el inserto a -80ºC para no depender de material de cámara tanto cuando se vaya a sintetizar la sonda o utilizar como testigos positivos en las membranas de futuros experimentos.

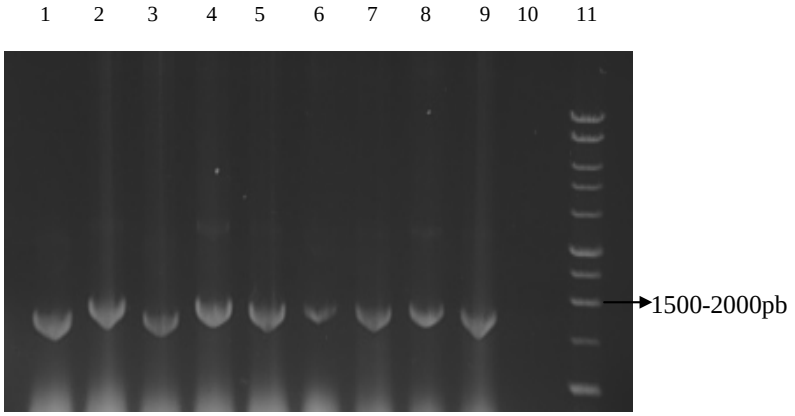

Figura 10. Gel de agarosa 0,7%, en buffer TAE 1X teñido con bromuro de etidio. Las muestras (carriles 1-9) corresponden a un pool de colonias de ADN plasmídico. Carril 10: vacio y carril 11: marcador de 1kb (Promega).

4.5. Secuenciación.

La secuenciación permitió obtener la secuencia completa del cADN del viroide de 359pb, que presentó alta homología con algunas secuencia de viroides de USA (Owens, R.A. y Thompson,S.M., 2005), Polonia (Podstolski,W., Gora-Sochacka,A. y Zagorski,W., 2006), Eslovenia (Virscek *et al.*, 2010) y Alemania, (Gruner *et al*., 1995).

El mismo análisis mostró diferencias con secuencias reportadas en Grecia (Malandraki *et al*., 2010), Francia e India, (Jeevalatha *et al*., 2010). A continuación se muestra la secuencia completa del cADN viroidal.

```
1 cggaattaaa ctcgtggttc ctgtggttca cacctgacct cctgagcaga aaagaaaaaa
61 gaaggcggct cggaggagcg cttcagggat ccccggggaa acctggagcg aactggcaaa
121 aaaggacggt ggggagtgcc cagcggccga caggagtaat tcccgccgaa acagggtttt
181 cacccttcct ttcttcgggt gtccttcctc gcgcccgcag gaccacccct cgcccccttt
241 gcgctgtcgc ttcggctact acccggtgga aacaactgaa gctcccgaga accgcttttt
301 ctctatctta cttgcttcgg ggcgagggtg tttagccctt ggaaccgcag ttggttcct
```

4.6 Validación de la sonda

La concentración de la sonda de PSTVd se estimó mediante calibración relativa aplicando espectrofotomería UV, resultando 496 ng/µl.

4.7 Especificidad de las sonda frente a virus analizados rutinariamente

La especificidad del diagnóstico se evaluó con la técnica de "dot blot" empleando una sonda obtenida mediante la técnica de amplificación via PCR, marcada con digoxigenina. En los ensayos se incluyeron extracciones de material vegetal de papa de la variedad "Chieftain" de hoja (Figura 12 A) y tubérculo (Figura 12 B), tejido sano (Figura. 12 carril 1).y material vegetal de los virus de PVY, PVX y PLRV como controles negativos (Figura. 12 carriles 3, 4 y 5).

Cuando la sonda fue enfrentada a extracciones de virus de papa rutinariamente analizados en los controles de sanidad, los resultados de las hibridaciones fueron positivos, mostrando ser específicos al solo observarse señal positiva en el sitio con la extracción conteniendo el ARN viroidal (Figura.12 carril 2).

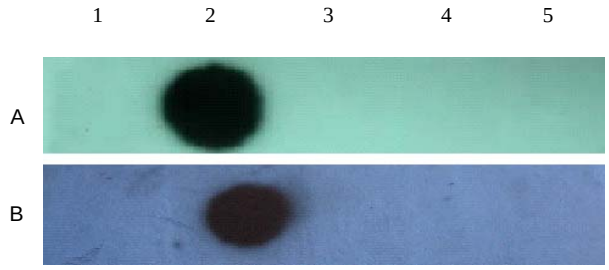

Figura 12. Dot blot con sonda ADN viroidal, marcada con DIG en Chieftain A. ARN de hoja, B. ARN de tubérculo. Las muestras corresponden a extracciones de papa carril 1: papa sana carril 2: PSTVd; carril 3: PVX; carril 4: PVY y carril 5: PLRV.

Se puede conclurír de los resultados de la Figura 12 una elevada especificidad de la sonda del viroide PSTVd al reaccionar únicamente con los controles positivos disponibles (carril 2) y no producir reacciones de hibridación inespecíficas con muestras de tejido que portan diferentes patógenos del cultivo de papa (carriles 3, 4 y 5) y con papa sana (carril 1).

La repetibilidad observada en cuanto a la producción de una señal para los controles positivos y negativos de PSTVd utilizados en los ensayos de hibridación fue del 100%. Todas las membranas hibridadas y reveladas en diferentes días, mostraron señales positivas para los controles positivos y negativos para los controles negativos.

4.8 Validación de la sensibilidad de la sonda sobre tejido vegetal

a) Evaluación de sensibilidad del método de extracción

La sensibilidad de la sonda sobre tejido vegetal fue evaluada comparando la señal obtenida por "dot blot" utilizando sonda de ADNc viroidal (Figura 13). Se sembraron diferentes extracciones de ácidos nucleicos obtenidas a partir de material vegetal de la cámara de crecimiento y se evaluó la sensibilidad y practicidad de los diferentes métodos para análisis masivos.

Primeramente se evaluaron las metodologías que no requerían kits comerciales; metodología de Flores, metodolgía de CIP y metodología de Fonseca empleándose un volumen correspondiente a 10mg de tejido infectado. (Figura 13, A, B y C respectivamente).

A partir de los resultados obtenidos se decidió continuar con los métodos de CIP y Fonseca por ser rápidos y de fácl realización, obteniéndose una señal positiva y de buena intensidad. (Figura13, B y C)

A B C

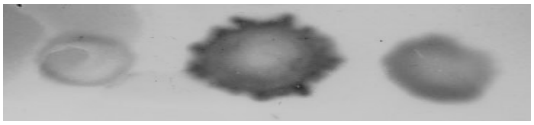

Figura 13. Dot- blot de extracciones de ARN, hibridado con sonda ADNc de PSTVd.
(A). Metodolgía Flores.
(B). Metodolgía CIP.
(C). Metodolgía Fonseca.

b) Sensibilidad de la sonda sobre extracciones de tejido vegetal

Para los ensayos de sensibilidad de la sonda sobre extracciones de tejido vegetal se empleó en la siembra un volumen de extracción de ARN de hojas de 10 µl, ya que se observó en la práctica que asegura una cantidad suficiente de partículas viroidales para detectar señales de hibridación con la suficiente intensidad para este tipo de ensayos. A partir del volumen inicial se realizaron diluciones seriadas con el fin de determinar el límite de sensiblidad de detección de la sonda en hoja. En la Figura 14, se observa el resultado de ensayos de hibridación con diferentes diluciones, visualizándose en la dilución 1/50 el límite de sensiblidad de la sonda, que equivale a 0.20 mg de tejido infectado con PSTVd para el método Tripure y CIP. Con el método de Fonseca el límite de sensibilidad es menor visualizandose en la dilución 1/5, que equivale a 2 mg de tejido infectado.

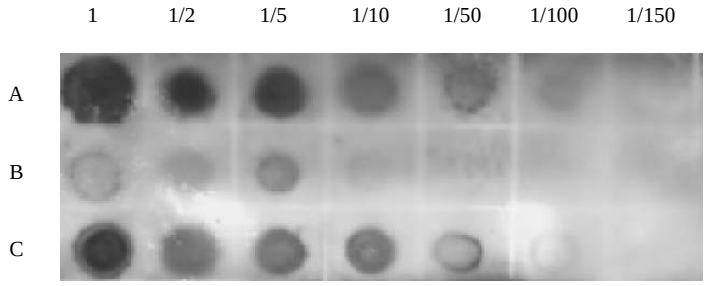

Figura 14. "Dot- blot"de extracciones de ARN, hibridado con sonda ADNc de PSTVd, con revelado quimioluminiscente. (A) Metodolgía Tripure, (B) Metodolgía Fonseca y (C). Metodolgía CIP. Se muestran las siembras de 10µl de extracción, sin diluir (primer carril) seguidas de las diluciones 1/2, 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/150.

De la Figura 14 también se puede concluír que con respecto a las extracciones utilizadas hasta ese momento tanto las metodologías Tripure como CIP tienen una sensibilidad similar. Por ser de menor costo económico y más rápida, se recomienda la utilización de la metodología de CIP para análisis masivos.

c) Ensayo de sensibilidad de la sonda de ADNc viroidal en tubérculos de uso corriente.

Con el fin conocer la sensibilidad de la técnica estudiada en análisis masivos de rutina, se realizaron ensayos con tubérculos infectados, provenientes de la cámara de crecimiento de los Laboratorios Biológicos del MGAP.

En estos ensayos se empleó la técnica de "Slot blot" que permite utilizar en cada siembra un volumen mayor de extracción de ARN y mayor cantidad de partículas viroidales en menor superficie de membrana.

Las extracciones empleadas fueron obtenidas con las metodologías CIP y Tripure. Se sembraron distintos volúmenes, que correspondían a cantidades de tubérculo de papa de 12mg, 9mg, 6mg y 3mg.

Con esta combinación de material vivo y sonda se minimizaría el tiempo del ensayo ya que el estudio se realizaría sobre el material recién llegado al país sin la necesidad del tiempo extra necesario para que aparezcan brotes, que era donde se observaban clásicamente los síntomas de la patología en la papa

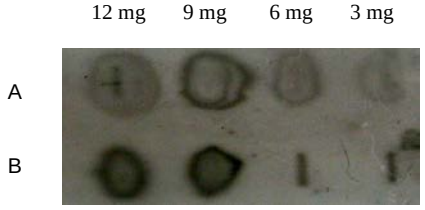

Figura 15. "Slot blot"con sonda de ADNc viroidal y revelado quimioluminiscente mostrando siembras de exracciones de ARN obtenidas a partir de distintas cantidades de tejido de tubérculo de papa. (A) metodología CIP, (B) metodología Tripure.

Como se observa en la Figura 15 se obtuvo una señal positiva de suficiente intensidad en la siembra de extracciones de tubérculos infectados con PSTVd, tanto con la metodología de Tripure como CIP, cuando se siembra la extracción que corresponde a 3 mg de tejido.

4.9. Comparación de métodos de revelado. Colorimétrico versus quimiliminicente

Con la finalidad de comparar la sensibilidad de los distintos métodos de revelado se ensayaron conjuntamente en placas radiográficas el método colorimétrico (Figura 16A) y el quimioluminiscente (Figura 16B). Con ambas metodologías se obtuvieron resultados positivos a pesar que ciertos autores han reportado en algunos casos que el método colorimétrico es menos sensible que el quimioluminiscente (CIP, 1993). Sin embargo para el viroide PSTVd no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a sensibilidad por lo que se aconseja su uso debido a que es más fácil de desarrolar y más económico para análisis masivos no requiriéndose infraestructuras adicionales como dispositivos especiales de revelado tales como un cuarto oscuro.

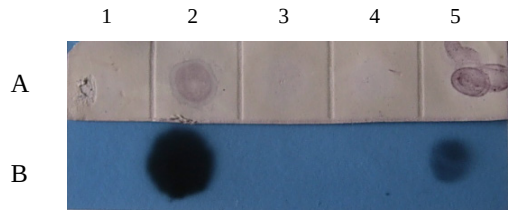

Figura 16. "Dot blot" hibridando la sonda de PSTVd con papa de la variedad Chieftain y con diferentes métodos de revelado: (A) colorimetría y (B) quimioluminicencia. Carril 1, 3 y 4: siembra de extracciones de papa sana, 2 y 5: controles positivos de 2 muestras inoculadas en tubérculo; carril 2: siembra de extracción de 6 mg de tejido infectado obtenido por métodoTripure y carril 5: siembra de extracción de 1,2 mg de tejido infectado obtenido con método CIP

4.10 Sensibilidad de la aplicación de la sonda viroidal sobre el producto obtenido por PCR

Con el objetivo de determinar la sensibilidad de la aplicación de la sonda del viroide sintetizada, sobre el producto de la amplificación vía PCR a partir de los extractos de ARN de tubérculos infectados se sembraron diluciones de los mencionados productos de amplificación diluídos (1/10, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/3000, 1/9000 y 1/12000) observándose luego del revelado por quimiluminicencia, una buena intensidad de la coloración en las distintas reacciones de detección.

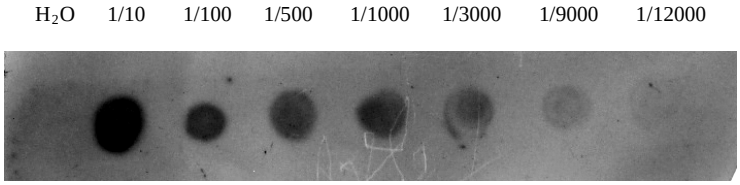

Figura 17. "Dot blot" con sonda de ADN viroidal revelado con el método quimioluminiscente. Se observan diversas diluciones de ADNc producto de amplificación por PCR.

A partir de las imágenes que se muestran en la Figura 17 se detecta intensidad suficiente de las diluciones seriadas desde 1/10 hasta 1/9000 que sería el límite de detección de la sonda. Dicha dilución corresponde a 55pg de ADN viroidal detectados con la técnica de "Dot blot." y revelado con el método quimioluminiscente. Aunque esta técnica no permite el empleo de un volumen mayor a 10*u*L estos resultados fueron un buen indicador de la sensibilidad obtenida con ésta técnica, sumamente sencilla a la hora de la siembra (Owens *et al.*, 1981).

5. Conclusiones

5. Conclusiones

- ✓ La detección del viroide PSTVd fue validada mediante la técnica de hibridación molecular en hojas y tubérculos de papa estando disponible para ser aplicada en análisis masivos.

- ✓ En la realización de ensayos masivos se observó que la técnica de extracción más adecuada es la metodología CIP por rápida, eficiente y tener menor costo económico. En segundo lugar se recomienda la aplicación del méodo Tripure.

- ✓ Se ajustaron las condiciones de la reacción de RT-PCR para el viroide PSTVd.

- ✓ Se obtuvo la sonda de ADNc marcada con digoxigenina para el viroide PSTVd.

- ✓ Se validó la sonda para PSTVd tanto para tejido de tallo como tubérculo, resultando ser específica en su poder de detección ya que no se detectó señal cuando se la empleó con otros patógenos muy agresivos para el cultivo de papa, ni frente a extracciones de tejido vegetal sano.

- ✓ El revelado de la hibridación, aplicando tanto el método quimioluminiscente como el colorimétrico resultaron ser muy sensibles y confiables para detectar el viroide de PSTVd, tanto para hoja como tubérculo y con las metodologías de extracción de ARN, CIP y Tripure.

- ✓ El tamaño del genoma completo pára el viroide PSTVd es de 359pb.

- ✓ Con el empleo de la técnica de hibridación se puede realizar diagnósticos masivos por lo que puede ser utilizado inmediatamente en Programas de Certificación y Sistemas de Cuarentena con resultados totalmente confiables.

6. Perspectivas Futuras

Los estudios y ensayos realizados en este trabajos constituyen una valiosa aproximación a ser aplicada en cualquier momento en Programas de Diagnóstico del Viroide PSTVd mediante hibridación molecular.

La aplicación de ésta metodología en Programas de Certificación y Sistemas de Cuarentena serían de utilidad para el diagnóstico eficiente de este viroide cuarentenario, y de ese modo conservar el estatus fitosanitario que tiene el país que se encuentra libre del mismo hasta el momento.

Se deberá continuar en el ajuste de las metodologías descriptas en este trabajo seguir con el objetivo de mejorar la precisión en los resultados y seguir disminuyendo el tiempo necesario para su aplicación.

Se puede aplicar la técnica de hibridación molecular para el diagnóstico de otros riesgos fitosanitarios por enfermedades cuarentenarias y no cuarentenarias. De este modo se potenciaría el empleo del tiempo al optimizar los tiempos de hibridación, revelado, poner otras etapas a realizar al mismo tiempo analizando conjuntamente varios patógenos a la vez.

7. Referencias Bibliográficas

7. Referencias Bibliográficas

Agrios, GN. (1991). Fitopatología. Ed. Limusa. Noriega Editores. México.

Altschul, S.F; Gish, W; Miller, W; Myers E.W y Lipman D.J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. J.Mol.Biol; 215:403-410.

Ambrós, S. y Flores, R. (1998). In vitro and in vivo self-cleavage of a viroid RNA with amutation in the hammerhead catalytic pocket. Nucleic Acids Res. 26, 1877-1833.

Ambrós, S., Hernández, C. y Flores, R. (1998). Genomic structure of three phenotypically different isolates of Peach latent mosaic viroid: implications of the existence of constraints limiting the heterogeneity of viroid quasispecies. J. Virol. 72, 7397-7406

Astruc, N. Marcos, J., Macquaire, G. Candresse, T. and Pallás, V.(1996). Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. Eur. J. Plant Pathol. 102:837-84.

Barrera, C. (1995). Características generales de los virus y la importancia de las enfermedades que Causan. Manual Técnico sobre Producción de Tubérculos - Semilla de Papa. Fascículo: S-II-1-95. Centro Internacional de la Papa. Perú.

Baumstark, R. y Riesner, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of the potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. Nucleic Acids Res. 23, 4246-4254.

Baumstark, R., Schröder, A. R. W. y Riesner, D. (1997). Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by change from a tetraloop to a loop E conformation. EMBO J. 16, 599-610.

Branch, A. D. y Robertson, h. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small Infectious rnas. Science 223, 450-455.

Branch, A. D., Benenfeld, B. J. y Robertson, H. D. (1988b). Evidence for a single Rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9128-9132

Branch, A. D., Robertson, H. D. y Dickson, E. (1981). Longer than unit lenght viroide Minus strands are present in RNA from infected plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6381-6385.

Bruening, G., Gould., A.R., Murphy, P.J., Symons, R.H. (1982). Oligomers of avocado sunblotch viroid are found in infected avocado leaves. FEBS Lett. 148: 71-78

CABI. (2000). Crop Protection Compendium. Global Module. 2nd. Edition. CAB International. UK.

CABI. (2000). Data sheet for Meloidogyne chitwoodi. Crop Protection Compendium. Global Module. 2nd. Edition. CAB International. UK

CIP (Perú). 1993. Ensayos inmunológicos con conjugados enzimáicos en membranas de nitrocelulosa. Ed. por Jayasinghe, U.; Salazar, L. F. Manual de Técnicas en Virología de Plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1 (TTU). Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.

Conejero, V., Picazo, I. y Segado, P. (1979). Citrus exocortis viroid (CEV): proteína alterations in different hosts following viroid infection. Virology 97, 454-456.

Conejero, V. y Semancik, J. S. (1977). Exocortis viroid: alterations in the proteins of Gynura aurantiaca accompanying viroid infection. Virology 77, 221-223.

De Blas, C., Zabalgogeazcoa, S. Castro, S. y Romero, J. (1996). Técnicas de detección de ácidos nucleicos virales. Pp. 255-274 in G. Llácer, M. López, A. Trapero y A.Bell, eds. Patología Vegetal. Phytoma. España.

Derrick, K., Beretta, M., Barthe, G., and Kayim, M. (2003). Identification of Strains of Citrus Tristeza virus by Subtraction hybridization. Plant Disease, 87:1355-1359.

Di Serio, F., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A. y Flores, R. (1996). Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruit disease. J. Gen. Virol. 77, 2833-2837.

Di Serio, F., Daròs, J. A., Ragozzino, A. y Flores, R. (1997). A 451-nucleotide circular RNA from cherry with hammerhead ribozymes in its strands of both polarities. J. Virol. 71, 6603-6610.

Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic Acid. III. Subcelular location of PSTV-RNA and the question of whether virions exists in Extracts or in situ. Virology 43, 75-98.

Diener, T. O. (1986). Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 83:58-62.

Diener, **T. O**. (1996). Origin and evolution of viroids and viroid-like satellites RNAs. Virus Genes 11, 119-131.

Diener, T. O. (1989). Circular RNAs: Relics of precellular evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 9370-9374.

Diener, T.O., Lawson, R.H. (1972). Chrysanthemum Stunt: A viroid disease. Virology 51: 94-101.

Domingo, E., Flavell, R. A, Y Weissmann, C. (1976). In vitro site-directed mutagenesis: generation and properties of an infectious extracistronic mutant of bacteriophage Qβ. Gene 1, 3-25.

Domingo, E. y Holland, J. J. (1994). Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses En: Evolutionary Biology of Viruses (S. S. Morse, Ed.), pp. 171-180. Raven Press, New York.

EPPO. (1996). Data Sheets on Quarantine Pests.
Web: www.eppo.org/QUARANTINE/virus/PSTVd/PSTVD0_ds.pdf

EPPO. (2000). European and Mediterranean Plant Protection Organization. EPPO. Plant Quarantine Retrieval System. PQR. Version (3.10).

EPPO. (2004). Normes OEPP/EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests. Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés.

Fernow, H. K. (1967). Tomato as a test plant for detecting mild strain of potato spindle tuber virus. Phytopathology 57:, 1347-1352

Flores, R. (1989). Synthesis of rnas specific to citrus exocortis viroid by a fraction rich innuclei from infected Gynura aurantiaca: examination of the nature of the products and solubilization of the polymerase-template complex. J. Gen. Virol. 70, 2695-2703.

Flores, R., Di Serio, F. y Hernández, C. (1997). Viroids: the non coding genomes. Semin. Virol. 8, 65-73.

Flores, R. y Durán-Vila, N. (1996). Viroides. 1º Ed. Patología Vegetal. Phytoma-España. 2 t. 1140 pp.

Flores, R. y Semancik, J. S. (1982). Properties of a cell-free system for synthesis of citrus exocortis viroid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6285-6288.

Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M. y Diener, T. O. (2000). Viroids. En Virus Taxonomy, 7th Rep. Intern. Com. Taxon. Viruses (M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. Mcgeoch, C. R. Pringle y R. B. Wickner, Eds.), pp. 1009-1024 Academic Press, San Diego.

Fonseca, M.E.N., Marcelino, L.H., Gander, E. (1996). A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroide in citrus medica with digoxigenin-labelled RNA probes. J. Virol. Methods 57: 203-207

Gago, S., Elena, S.F., Flores, R., Sanjuá, R. (2009). Extremely High Mutation Rate of a Hammerhead Viroid.. Science Magazine Vol. 323 no. 5919 p. 1308

García-Breijo, F. J., Garro, R. y Conejero, V. (1990). C7(P32) and C6(P34) PR Proteins induced in tomato leaves by citrus exocortis viroid infectionare chinitinases. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36, 249-260.

González- Pérez L., Sotto M., Ortiz I. y Peralta E. (2001) Determinación de parámetros analíticos de las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) fitopatología vol36 pp. 24-31

Grill, L. K. y Semancik, J.S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected Gynura aurantiaca. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 896-900.

Gross, H. J., Liebl, U., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K. y Sänger, H. L. (1981). A severe and mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide Exchanges only. Biosci. Rep. 1, 235-241.

Gruner,R., Fels,A., Qu,F., Zimmat,R., Steger,G. and Riesner,D. (1995). Gerhard Steger, Institut fuer Physikalische Biologie, Heinrich-Heine Universitaet, Universitaetsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany.

Harders, J., Lukács, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T. M., y Riesner, D. (1989).Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridisation and confocal laser scanning microscopy. EMBO J. 8, 3941-3949.

Harrison, T., 1994. Principios de Medicina Interna 14ª edición en español por Mc Graw-Hill Interamericana de España Berkon, R El Manual Merck, 9ª edición española. Editorial Océano.

Hernández, C. y Flores, R. (1992). Plus and minus rnas of peach latent mosaic self-Cleave in vitro via hammerhead structures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 3711-3715.

Hernández, C., Elena, S. F., Moya, A. y Flores, R. (1992b). Pear blister canker viroide is a member of the apple scar skin subgroup (apscaviroids) and has also sequence homologue swith viroids from other subgroups. J. Gen. Virol. 73, 2503-2507.

Hutchins, C. J., Keese, P., Visvader, J. E., Rathjen, P. D., Mcinnes, J. L. Y Keese, P. y Symons R.H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intramolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 82:4582-4586.

Igloi, G.L. (1983). A silver stain detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. Anal.Biochem. 134:184-188.

Jayasinghe, U.; Salazar, L. F. (eds.) 1993. Manual de técnicas en virología de plantas. Unidad Técnica de Capacitación 1(TTU). CIP, Lima, Peri.

Jeevalatha,A., Priyanka,K. y Chakrabarti,S.K. (2010). Molecular characterization of PSTVd isolates intercepted in potato germplasm collections in India.

Keese, P. y Symons R.H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intramolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A. 82:4582-4586.

Koltunow, A. M. y Rezaian, M. A. (1988). Grapevine yellow speckle viroid: structural Features of a new viroid group. Nucleic Acids Res. 16, 849-864.

Koltunow, A.M., Rezaian, M.A. (1989). A scheme for viroid classification. Intevirology 30:194-201.

Kruger, K., Grabowski, P. J., Zaug, A. J., Sands, J., Gottschling, D. E. y Cech, T. R. (1982). Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. Cell 31, 147-157.

Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M. (1992). RNA progeny of an infectious two-base deletion cDNA mutant of potato spindle tuber viroid (PSTVd) acquire two nucleotides in Planta. Virology, 187:565-572.

Lakshman, D.K., Tavantzis, S.M. (1993). Primary and secondary structure of a 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. Arch. Virol., 128:319-331

Lakshman, D.K.; Hiruki, C.; Wu, X.N.; Leung, W.C. (1986) Use of P RNA probes for the dot-hybridization detection of potato spindle tuber viroid. Journal of Virological Methods 14, 309-319.

Malandraki,I., Papachristopoulou,M. and Vassilakos,N. (2010).First report of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in ornamental plants in Greece. New Dis. Rep. 21, 9.

Manual de Técnicas en Virología. (1993). Preparación de Muestras para la Detección de PSTVd mediante Hibridacón de ácidos nucleicos. pp:1-4.

Murcia N, Serra P, Olmos A, Durán-Vila N (2009) A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. Mol Cell Probes 23:95-102.

Navarro, B., Flores, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead ribozymes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 94:11262-11267.

Navarro, J. A. y Flores, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity Strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. EMBO J. 19, 2662-2670

OEPP/EPPO (1978) Data sheets on quarantine organisms No. 97, Potato spindle tuber viroid. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 8 (2).

Ollivier F. (2004) Le hybridation moléculaire: une technique de détection du Potato spindle tuber viroide aux plans de surveillance. Bulletin OEPP/EPPO vol34, pp.123-126

Owens, R.A. y Diener T.O. (1981). Sensitive and rapid diagnosis of potato spindle tuber viroid disease by nucleic acid hybridization. Science 213:670-672.

Owens,R.A. and Thompson,S.M. (2005). Mutational analysis does not support the existence of a putative tertiary structural element in the left terminal domain of Potato spindle tuber viroide. J. Gen. Virol. 86 (PT 6), 1835-1839

Pagliano G. (2000) Diagnóstico y caracterización molecular de los viroides presentes en plantaciones citrícolas de Uruguay. Tesis de Maestría. Universidad Internacional de Andalucía.

Palacio-Bielsa, A. (1999). La exocortis y la cachexia de los cítricos: mejora de los métodos de detección y caracterización. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad de Valencia, España.

Podstolski,W., Gora-Sochacka,A. and Zagorski,W. (2006). Co-inoculation with two non-infectious cDNA copies of potato spindle tuber viroide (PSTVd) leads to the appearance of novel fully infectious variants. Acta Biochim. Pol. 52 (1), 87-98 (2005)

Puchta, H., Ramm, K. y Sänger, H.L. (1988). The molecular structure of hop latent viroid (HKV) a new viroid occurring worldwide in hops. Nucl. Acids Res. 16, 4197-4216.

Querci, M., R.A., Owens, C.Vargas y L.F. Salazar. (1995) Detection of Potato Tuber Viroid in Avocado Growing in Perú. Plant Disease 79:196-202.

Rivera-Bustamante, R. F. y Semancik, J. S. (1989). Properties of a viroid-replicating complex solubilized from nuclei. J. Gen. Virol. 70, 2707-2716.

S.N.A.P. ô Gel Purification Kit For Rapid Purification of DNA Fragments from Agarose Gelstools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/snapgel_man.pdf

Salazar. L.F. (1995). Los Virus de la Papa y su Control. Centro Internacional de la Papa. 226 p. Lima Perú.

Sambrook, K., Frisch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. 3v. (New York: Cold Spring Harbor).

Con formato: Inglés (Reino Unido)

Con formato: Español (alfab. internacional)

Sänger, H.L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H.J. y Kleinschmidt, A.K. (1976). Viroids are single stranded covelently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. Proc. Natl. Acad. Sci.. U.S.A. 73, 3852-3856.

Sänger, H.L. (1987) Viroid function. Viroid replication. En "The Viroids" (T.O. Diener, ed.) pp. 117-166. Plenum, New York and London.

Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., Owens, R.A. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenecity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10104-10108

Schindler, I. M. y Mühlbach, H. P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependent RNA Polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. Plant Sci. 84, 221-229

Schumacher, J., Randles, J.W. y Riesner, D. (1983). A two-dimentional electrophoretic techinique for detection of circular viroids and virusoids. Anal.Biochem. 135:288-295.

Semancik, J.S. y Harper, K.L. (1984). Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroids and the question of the specificity of RNA polynerase activity. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 81:4429-4433.

Semancik, J. S. y Vanderwuode, W. J. (1976). Exocortis viroid: cythopathic effects at the Plasma membrane in association with pathogenic RNA. Virology 69, 719-726.

Semancik, J.S., Szychowski, A.A., Rzkowski, A.G., Symons, R.H. (1993) Isolate of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. Jour.Gen. Virology, 74;2427-2436.

Singh, R.P. y Fernow, K.H. (1980). Tubérculo ahusado. En Compendio de Enfermedades de la Papa. W. J. Hooker editor. The American Phyopathological Society. St Paul, Minnesota. Pp123-125.

Singh, R. And Singh ,M. (1998) Specific Detection of Potato Virus A in Dormant Tubers by Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction., Agriculture and Agri-Food Canada, Potato Research Centre.Canada. Plant Dis, 84:803-805.

Sogo, J. M., Koller, T. y Diener, T. O. (1973). Potato spindle tuber viroid. X. Visualization and size determination by electron microscopy. Virology 55, 70-80.

Sosa, C. (1997). Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas: Diagnóstico fitosanitario. Pp 187-202.

Con formato: Español (España - alfab. tradicional)

Con formato: Español (España - alfab. tradicional)

Con formato: Inglés (Estados Unidos)

Syller, J., Marczewski, W., Pawlowcicz, J. (1997). Transmission by aphids of potato spindle tuber viroid Encapsidated by potato leafroll luteovirus particles. European Journal of Phytopathology, 103(3), 285-289.

Symons, R. H. (1985). Comparison of plus and minus forms of viroids and virusoids. Plant Mol. Biol. 4, 293-304

Raymer, W.B., O'Brien, M.J. y Merriam, D. (1964). Am. Potato J., 41: 311-314.

Takahashi, T., Yaguchi, S., Oikawa, S. y Kamita, N. (1972). Subcellular location of Hop stunt viroid. Phytopath. Z. 103, 285-293.

Tornero, P., Conejero, V. Y vera, P. (1997). Identification of a new pathogen induced Member of the subtilisin like processing protease family from plants. J. Biol. Chem. 272,14412-14419.

Tripure Isolation Regeant kit, Roche (2003). (www.roche-applied-science.com)

Tsagris, M., Tabler, M., Mühlbach, H.P., Sänger, H.L. (1987). Linear oligomeric potato spindle tuber viroid (PSTVd) RNAs are accurately processed in vitro to the monomeric circular viroid proper when incubated with a nuclear extract from healthy potato cells. EMBO J., 6:2173-2183.

Tsagris, M., Tabler, M. y Sänger, H. L. (1991). Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation.Nucleic Acids Res. 19, 1605-1612.

Vera, P. y Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins in tomato. P69 as an alkaline Endoproteinase. Plant Phisiol. 88, 58-63.

Vera, P. y Conejero, V. (1989). The induction and accumulation of the pathogenesis-related P69 proteinase in tomato during citrus exocortis viroid infection and in response to Chemicals Treatments. Physiol. Mol. Plant Pathol. 34, 323-334.

Vera, P., Tornero, P. y Conejero, V. (1993). Cloning and expression analysis of a viroid-induced peroxidase from tomato plants. Mol. Plant-microbe interact. 6, 790-794.

Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. and Geric Stare, B. (2010). Potato spindle tuber viroid isolates and clones detected in Slovenia. Plant Protection Department, Kmetijski institut Slovenije (Agricultural Institute of Slovenia), Hacquetova ulica 17, Ljubljana SI-1000, Slovenia.

Visvader, J. E. y Symons, R. H. (1985). Eleven new sequences variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with the pathogenicity. Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920.

Con formato: Sueco (Suecia)

Visvader, J. E. y Symons R. H. (1986). Replication of in vitro constructed viroid mutants: Location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid. EMBO J. 5, 2051-2055.

Weidemann HL y Buchta U (1998) A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (pstvd) by RT-PCR. Potato Research 41, 1-8.

Yang, T.C., and W.J. Hooker. (1977). Albinism of potato spindle tuber viroir infected Rutgers tomato in continuous light. Am. Potato J. 54: 519-530