

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE CIENCIAS

DIAGNÓSTICO DE *CBCVd* (*Cocadviroide*) y *CVd-VI* (*Apscaviroide*) EN PLANTACIONES CITRÍCOLAS DEL URUGUAY MEDIANTE TÉCNICAS DE DETECCIÓN BASADAS EN HIBRIDACIÓN MOLECULAR NO ISOTÓPICA.

por

Rodolfo UMAÑA CASTRO

**TESIS presentada como uno de los requisitos
para obtener el título de *Magíster* en Biotecnología**

Directora de Tesis: Ing.Agr. Gabriela Pagliano Mauri, MSc.

Director Académico: Lic. Juan R. Arbiza, PhD.

Trabajo experimental realizado en el Laboratorio de Biotecnología, Dpto. Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR. En el marco del proyecto PDT 74/19 “Desarrollo y validación de una herramienta de diagnóstico rápido para la detección de todos los viroides presentes en citrus”

MONTEVIDEO

URUGUAY

2010

Agradecimientos

- A la Ing.Agr.Gabriela Pagliano por permitirme desarrollar este trabajo en el marco de su proyecto de investigación y por la orientación en el mismo. A su vez, al Dr. Juan Arbiza por aceptar la dirección académica de este estudio dentro del programa de posgrado en Biotecnología de la Facultad de Ciencias.
- A la Dra. Nuria Durán-Vila por sus consejos, aportes, charlas y el gran apoyo que recibí de su parte en el ámbito de su visita a Uruguay.
- Al Dr.Takao Ito del NIFTS, Japón por ceder amablemente los plásmidos recombinantes con el genoma completo de los viroides de este estudio, contribución que permitió desarrollar esta investigación.
- A los miembros del tribunal: Dr.Omar Borsani, MSc.Mercedes Peyrou y Dr. Rodney Colina por sus aportes, sugerencias y correcciones.
- Al programa de posgrado que me abrió las puertas para desarrollar este estudio y en especial a la Dr. Mónica Marín por su apoyo.
- Al Dr. Fernando Rivas, Ing.Agr.Ana Bertalmío y al MSc. Jacques Borde por su colaboración en el muestreo de material de campo y controles positivos.
- A la Dr. Clara Pritsch por su apoyo en la finalización de esta investigación, sus valiosos aportes y comentarios.
- Al Dr. Pablo Speranza por ser un gran maestro, un gran amigo y por su constante estímulo para finalizar esta tesis.
- Al MSc. Jorge Pereira por su continuado apoyo, solidaridad, energía y amistad. A la Dra.Cristina Mazzella y a la MSc.Paola Gaiero por alentarme siempre.
- A las/los chicas/os del Laboratorio de Biotecnología y Genética de la Facultad de Agronomía por su amistad y sus enormes energías en el día a día.
- A mi familia en Costa Rica especialmente a Damaris, Erick, Josué y María José por dirigir todo su amor, paciencia y buenos deseos hacia el Sur.
- A mi familia en Uruguay: Ana, Emilia, Guillermo, Álvaro y Alma por todo su amor, comprensión, solidaridad, paciencia y apoyo incondicional.

Tabla de Contenido

Agradecimientos	ii
Tabla de Contenido	iii
Indice de Tablas y Figuras	vi
.....	vii
Resumen	viii
Introducción	1
Los viroides como entidad biológica.....	1
<i>Características y estructura molecular de los viroides</i>	2
<i>La Familia Pospiviroidae</i>	3
<i>i) Dominios estructurales</i>	3
<i>ii) Procesos replicativos: enzimas involucradas</i>	4
<i>iii) Movimiento del viroide en la planta</i>	5
<i>iv) Variabilidad de los viroides</i>	6
<i>Clasificación de los viroides cítricos</i>	6
<i>Sintomatología y patogénesis</i>	11
<i>Transmisión y propagación de los viroides cítricos</i>	13
<i>Expresión de síntomas de los viroides cítricos</i>	14
<i>Rendimientos de cultivares cítricos infectados con viroides</i>	16
Métodos de detección y diagnóstico de viroides.....	17
<i>Métodos Biológicos: bioamplificadores de viroides</i>	18
<i>Métodos Moleculares: detección del genoma viroide</i>	19
La Citricultura en el Uruguay.....	25
<i>Antecedentes generales de viroides cítricos en Uruguay y distribución en la región</i>	26
<i>Programa de Cuarentena, Saneamiento y Certificación de germoplasma cítrico</i>	27
Objetivo General	31
Objetivos Específicos.....	31
Materiales y Métodos	32
<i>Material vegetal</i>	32
<i>Plásmidos recombinantes</i>	33
<i>Transformación de células E. coli químico o electrocompetentes con plásmidos recombinantes pCR2.1TS4.7 / pCR2.1S10S EILabb</i>	33
<i>Colecta de material vegetal de cidros inoculados y plantas de campo de diferentes variedades cítricas</i>	34

<u>Métodos de Extracción de ARN.....</u>	<u>35</u>
<u>Cuantificación de Ácidos Nucleicos.....</u>	<u>36</u>
<u>Transcripción reversa (RT) y amplificación por reacción de polimerización en cadena (PCR).....</u>	<u>37</u>
<u>Análisis de secuencia del genoma viroidal.....</u>	<u>39</u>
<u>Transcripción in vitro del genoma total de CBCVd y CVd-VI contenido en vectores plasmídicos.....</u>	<u>40</u>
<u>Elaboración de sondas marcadas por PCR.....</u>	<u>40</u>
<u>Hibridación Molecular no isotópica con sondas marcadas DIG-11-dUTP.....</u>	<u>41</u>
<u>Resultados.....</u>	<u>44</u>
<u>Capítulo 1. Evaluación de métodos de extracción de ARN viroide en referencia a herramientas moleculares de diagnóstico disponibles y caracterización de la técnica Northern blot en cuanto a sensibilidad y eficiencia diagnóstica en variedades cítricas colectadas a campo.....</u>	<u>44</u>
<u>Efecto del método de extracción de ARN en el nivel efectividad diagnóstica de tres metodologías de detección viroide: RT-PCR, Northern blot y Dot blot</u>	<u>45</u>
<u>Sensibilidad y eficiencia del método Northern Blot en la detección individual o de mezclas de viroides en tejido infectado</u>	<u>47</u>
<u>Capítulo 2. Herramientas moleculares PCR y transcripción reversa para la síntesis y verificación de secuencias completas del genoma de CBCVd y CVd-VI.....</u>	<u>51</u>
<u>Reconocimiento de identidad y generación de plásmidos recombinantes control.....</u>	<u>51</u>
<u>Ajuste de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....</u>	<u>52</u>
<u>Ajuste de la transcripción reversa-PCR para las especies CBCVd y CVd-VI.....</u>	<u>53</u>
<u>Capítulo 3. Caracterización de sondas marcadas DIG-11-dUTP y determinación de parámetros diagnósticos de las especies CBCVd y CVd-VI para el análisis de rutina en material de campo.....</u>	<u>58</u>
<u>Elaboración y caracterización de sondas moleculares para el diagnóstico de CBCVd y CVd-VI.....</u>	<u>58</u>
<u>Estudio de parámetros diagnósticos de las hibridaciones moleculares Northern blot.....</u>	<u>61</u>
<u>Relevamiento de plantaciones cítricas en Uruguay para diagnóstico molecular de CBCVd y CVd-VI.....</u>	<u>65</u>
<u>Diagnóstico Molecular de CBCVd y CVd-VI en material vegetal a campo de zonas cítricas de importancia nacional.....</u>	<u>67</u>
<u>Discusión.....</u>	<u>68</u>
<u>Capítulo 1. Evaluación de métodos de extracción de ARN viroide en referencia a herramientas moleculares de diagnóstico disponibles y caracterización de la técnica Northern blot en cuanto a sensibilidad y eficiencia diagnóstica en variedades cítricas colectadas a campo.....</u>	<u>68</u>
<u>Rendimiento de la extracción de viroides: cuantificación y pureza.....</u>	<u>68</u>
<u>Efecto del método de extracción de ARN en las técnicas RT-PCR, Northern blot y Dot blot.....</u>	<u>70</u>
<u>Sensibilidad y eficiencia del método Northern blot en la detección individual o de mezclas de viroides en tejido infectado</u>	<u>72</u>

<u>Capítulo 2. Herramientas moleculares PCR y transcripción reversa para la síntesis y verificación de secuencias completas del genoma de CBCVd y CVd-VI.</u>	<u>73</u>
<i>Ajuste de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y RT-PCR.....</i>	<i>73</i>
<i>Reconocimiento de la identidad de amplificaciones inespecíficas obtenidas por RT-PCR.: posibles uniones entre cebadores y ARNs del hospedero.....</i>	<i>74</i>
<u>Capítulo 3. Caracterización de sondas marcadas DIG-11-dUTP y determinación de parámetros diagnósticos de las especies CBCVd y CVd-VI para el análisis de rutina en material de campo.....</u>	<u>76</u>
<i>Sondas moleculares CBCVd y CVd-VI: eficiencia del marcaje y determinación de las uniones con ADNc de alta similitud de secuencia.....</i>	<i>77</i>
<i>Estudio de parámetros diagnósticos de las hibridaciones moleculares Northern blot: Sensibilidad y especificidad.....</i>	<i>78</i>
<i>Relevamiento de variedades cítricas en zonas de importancia nacional: diagnóstico molecular de CBCVd y CVd-VI.....</i>	<i>82</i>
<u>Conclusiones.....</u>	<u>85</u>
<u>Bibliografía.....</u>	<u>88</u>
<u>Anexos.....</u>	<u>105</u>

Índice de Tablas y Figuras

Gráfica

Tabla

Estructura secundaria del genoma ARN completo de <i>CVd-VI</i> (<i>Pospiviroidae</i>)	4
Clasificación de los viroides cítricos de la familia <i>Pospiviroidae</i> según la última evaluación del ICTV.	8

Figura

Pág.

Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de ARN viroide mediante RT-PCR con cebadores <i>CEVd</i> , Northern Blot y Dot blot con sondas <i>CEVd-DIG</i> .	47
Análisis de sensibilidad de la técnica Northern blot para tejido colectado a campo.	48
Ensayo de eficiencia de la técnica Northern blot para muestras colectadas a campo.	2
Valores de intensidad de señal (Unidades Relativas) obtenidas en hibridaciones Northern blot.	50
Ajuste de la reacción PCR utilizando plásmidos recombinantes con inserto del genoma total de <i>CBCVd</i> mediante reacción con gradiente de temperatura y RT-PCR.	51
Ajuste de la reacción PCR utilizando plásmidos recombinantes con inserto del genoma total de <i>CVd-VI</i> mediante reacción con gradiente de temperatura y RT-PCR.	53
Ajuste de RT-PCR y productos de reacción de muestras cidro Etrog extraídas con el método EVC.	54
Southern blot de productos de RT-PCR <i>CBCVd</i> y <i>CVd-VI</i> e hibridación con sonda <i>CBCVd-DIG</i> (A) y <i>CVd-VI-DIG</i> (B).	57
Sonda <i>CBCVd</i> marcada con DIG-11-dUTP mediante PCR y ensayo de eficiencia del marcaje no radioactivo respecto a un control ADN plasmídico lineal marcado.	57
Ensayo de hibridación de las sondas marcadas <i>CBCVd</i> y <i>CVd-VI</i> frente a diferentes productos de PCR que poseen diversos niveles de similitud de secuencia y apareamiento de bases.	58
	60

Figura**Pág.**

Análisis de sensibilidad Northern blot en muestra cidro Etrog infectada con <i>CBCVd</i> .	
Análisis de sensibilidad Northern blot de muestras control positivo de <i>CBCVd</i> y <i>CVd-VI</i> reconstruidas mediante transcripción in vitro.	62
Ensayo de especificidad Northern blot con sondas marcadas <i>CBCVd-DIG</i> y <i>CVd-VI-DIG</i> frente a diferentes muestras de plantas a campo.	64
Relevamiento de plantas a campo de diferentes zonas citrícolas de Uruguay.	65
Diagnóstico molecular de rutina mediante hibridación Northern Blot con cóctel de sonda de <i>CBCVd</i> y <i>CVd-VI</i> frente a diferentes muestras de plantas a campo.	66
	67

Tabla**Pág.**

Colección de material de referencia de plantas indicadoras cidro Etrog y plantas colectadas a campo, indicando las especies viroides que las infectan y la técnica diagnóstica empleada	32
Análisis de similitud entre genomas viroides cítricos mediante ensayos <i>in silico</i> con alineamiento Blastn <i>2sequences</i> .	61
Colecta de material vegetal de diferentes zonas citrícolas de importancia nacional para diagnóstico molecular de <i>CBCVd</i> y <i>CVd-VI</i> .	66

Anexos**Pág.**

	105
Graficas de regiones de similitud entre genomas viroides cítricos mediante alineamiento basado en Blastn <i>2sequences</i>	
Colecta de material vegetal de diferentes zonas citrícolas de importancia nacional. Localización, zona y código de las muestras de campo colectadas para cada tipo de variedad	106

Resumen

Los viroides son patógenos subvirales constituidos por una molécula de ARN cadena simple, covalentemente cerrada, no codificante y con un fuerte apareamiento intramolecular. Los viroides cítricos pertenecen a la familia *Pospiviroidae*, la cual se compone de los géneros *Pospiviroidae*, *Hostuviroidae*, *Cocadviroidae* y *Apscaviroidae*, su genoma tiene un tamaño entre los 284-375nt. La vía de transporte de los viroides en la planta, es el floema, mostrando una elevada acumulación. El viroide de la corteza agrietada de los cítricos (*CBCVd*) pertenece al género *Cocadviroidae*, consta de 284-286nt y es definido como un viroide quimérico de tipo mosaico. Por otro lado, es considerado como un patógeno de baja distribución mundial presentando una disminuida ocurrencia en plantaciones cítricas. El viroide VI de los cítricos (*CVd-VI*) está incluido dentro del género *Apscaviroidae* con un tamaño de 329-331nt. El *CVd-VI* presenta una elevada similitud de secuencia con otros viroides cítricos y su distribución es exclusivamente regional, reportándose en Japón con una baja frecuencia de aparición en plantaciones cítricas comerciales. Estos patógenos no presentan transmisión mediante ningún vector, sin embargo logran transmitirse eficientemente por propagación vegetativa y de manera mecánica. Las plantaciones infectadas con viroides, presentan irregularidades en su crecimiento, rendimientos en la cosecha y la calidad de los frutos. En general, diferentes técnicas moleculares reportadas que permiten diagnosticar la presencia de viroides en plantas cítricas comerciales implican una fase de amplificación del patógeno en una planta indicadora, como el cidro Etrog. Sin embargo, recientemente, han sido desarrollados métodos moleculares de diagnóstico de viroides mediante hibridaciones moleculares PAGE-Northern blot acopladas a un método de extracción de ARNvd de material de campo. Estos métodos buscan disminuir los tiempos de análisis, mejorar la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica y la utilización de productos de baja toxicidad y no radiactivos que permiten realizar el diagnóstico directamente de plantas cítricas comerciales. En Uruguay, han sido reportadas cuatro especies de viroides cítricos (*CEVd*, *CBLVd*, *HSVd* y *CDVd*) a partir de cidros inoculados con aislados de campo, sPAGE e hibridaciones Dot blot y Northern blot de este mismo tejido, no detectándose el *CBCVd*, mientras que el *CVd-VI* no fue analizado. Por lo anterior, implementar un método molecular de mayor sensibilidad y con menores tiempos de análisis para la detección de *CBCVd* y *CVd-VI*

en material vegetal de campo, resuelve la ocurrencia de estos patógenos en Uruguay. La incorporación de esta herramienta biotecnológica en acciones de mejora Fitosanitaria, Certificación y Cuarentena de Citrus asistiría al desarrollo de plantas libres de viroides en nuestro país. La estrategia de diagnóstico molecular propuesta para este estudio, se basa en hibridaciones Northern blot con sondas no-radiactivas frente a ARN obtenido de material vegetal en condiciones de campo. Para ello, cuantificaciones de ácidos nucleicos y abordajes comparativos entre diferentes métodos de extracción y distintas herramientas moleculares de detección indican que el método EVC-Northern blot genera resultados diagnósticos robustos y confiables. Se realizaron ensayos generales de sensibilidad y eficiencia con material vegetal de campo utilizando los modelos experimentales *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd* y *CDVd*, revelando una sensibilidad diagnóstica entre los 8-12mg de tejido fresco (0.5uL a 0.75uL de ARN extraído del floema). A su vez, se observan elevados niveles de saturación de la placa radiográfica para el volumen de extracción recomendable (20uL) en esta técnica. Por otro lado, la determinación de un intervalo de presencia/ausencia del patógeno mediante densitometría de las señales de hibridación reveló que muestras entre los 60UR y 160UR presentan infección. Mediante la obtención en volumen de plásmidos recombinantes con el inserto del genoma completo de *CBCVd* y *CVd-VI* se optimizó la reacción PCR y se ajustó la RT-PCR con material cidro infectado. Sin embargo, amplificaciones inespecíficas y artefactos en la reacción son frecuentes en nuestras condiciones, indicando que esta técnica podría limitar la confiabilidad para el diagnóstico viroide, pero ser apta para fines de recuperación, clonación y secuenciamiento del patógeno. Se elaboraron sondas para *CBCVd* y *CVd-VI* mediante PCR generando ADNc-viroide marcado con digoxigenina. Estas sondas forman híbridos de baja estabilidad por apareamientos imperfectos con ADNc viroides de alta similitud de secuencia, sin embargo, en ninguno de los ensayos Northern blot se evidenció la formación de híbridos entre ARN del hospedero o ARNvd inespecífico con las sondas *CBCVd* o *CVd-VI*, pero si la generación de señales frente a controles positivos naturales y artificiales, demostrando una alta especificidad sin reacciones cruzadas frente a material vegetal a campo sano e infectado con otros viroides. La sensibilidad que presenta la técnica Northern blot con sondas *CBCVd*-DIG en material cidro infectado es de 2-4mg de tejido fresco (0.125uL a 0.25uL de ARN) mostrando elevadas señales de saturación, hasta ocho veces menos del volumen de ARN recomendado para esta técnica. Se sintetizaron transcritos monoméricos con la finalidad de reconstruir controles positivos artificiales para *CBCVd*

y *CVd-VI*. Ensayos de sensibilidad con estos controles revelaron, en nuestras condiciones, un límite de detección entre 273-321pg de ARNcopia del viroide. Se realizó un muestreo exploratorio de 84 árboles de diferentes variedades cítricas en seis departamentos de relevancia nacional, dirigido en su mayoría hacia plantas que presentan sintomatología de tipo viroide. En las muestras analizadas no se detectaron señales positivas frente a cada una de las sondas *CBCVd-DIG* y *CVd-VI-DIG*, indicando que las especies *CBCVd* y *CVd-VI* no están presentes en las zonas citrícolas examinadas, generalizando una posible tendencia para todo el territorio nacional en base a la robusta prospección ejecutada. Este estudio confirma la tendencia mundial de baja distribución de estos viroides, reporta un diagnóstico exhaustivo de *CBCVd* y *CVd-VI* único en Uruguay y la región mediante un abordaje Northern blot de alta sensibilidad y confiabilidad. Esta herramienta biotecnológica implementada está disponible para la incorporación en posibles acciones de Saneamiento, análisis de bloques fundación, protección fitosanitaria de germoplasma exótico, variedades domésticas, Certificación y Cuarentena de Citrus en Uruguay.

Introducción

Los viroides como entidad biológica

Los viroides son las entidades biológicas más simples descritas hasta el momento y el único agente infeccioso restringido al reino vegetal, presentando una diversa gama de huéspedes. Poseen la capacidad de replicarse autónomamente en células susceptibles, representando la forma más elemental de parasitismo. Estos replicones infecciosos mantienen una organización estructural mínima, constituidos por una molécula de ARN cadena simple, covalentemente cerrada, no codificante y con un fuerte apareamiento intramolecular. Los viroides presentan un tamaño molecular en el orden de 10^2 - 10^3 nt, similar a los ARN satélites, a su vez, 10 veces menor que el virus ARN mas pequeño y unas 60 veces menor que el genoma ARN del virus de la tristeza de los cítricos (Flores, 2001). Estos patógenos subvirales se acumulan de forma sistémica en el huésped luego de ingresar en el tejido, de tal manera, localizan la maquinaria replicativa del hospedero, reclutan y fuerzan a los factores de esta maquinaria para su propia replicación; se trasladan hasta el sistema vascular y se difunden a través de toda la planta completando su ciclo infectivo (Flores *et al.*, 2005). Los viroides tienen propiedades moleculares y biológicas propias que los distinguen de los virus y de los ARNs satélites, destacándose principalmente que su ciclo infectivo está exclusivamente mediado por factores del huésped, dependiendo funcionalmente de la maquinaria transcripcional de la planta infectada (Tabler y Tsagris, 2004). El estudio de los viroides en cuanto a su patología vegetal es una de las líneas de investigación que hoy en día mantiene un amplio desarrollo, ya que se ha demostrado que varias enfermedades de plantas son de etiología producida por viroides. Se conocen hasta el momento, unas 35 especies de viroides, distribuidas en 2 grandes familias y 8 géneros, en su mayoría relacionadas con algún tipo de patología. El abordaje de aspectos prácticos en cuanto a la implementación, transferencia y puesta a punto de nuevas técnicas de diagnóstico, asociado al desarrollo de Programas de Certificación, Cuarentena y vigilancia fitosanitaria, han sido de mucha utilidad para el mantenimiento de plantas libres de viroides y la protección de cultivos sensibles.

Características y estructura molecular de los viroides

Estructura primaria

La molécula viroide tiene un tamaño que oscila entre los 246 nt a 401 nt y su secuencia de nucleótidos adopta conformaciones con fuerte autocomplementariedad (64% al 73% de sus bases y un porcentaje G:C promedio superior al 50%). Debido a esto, se producen estructuras plegadas y muy compactas que mantienen a la estructura primaria como organización biológica relevante, ya que determina la conformación del ARN y la presencia de motivos que median la interacción del viroide con factores del huésped (Daros *et al.*, 2006). Los viroides se clasificaron en dos familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, según sus diferencias de secuencia de las zonas conservadas y la capacidad de autoclivaje de algunos de ellos (Koltunow y Rezaian, 1989), manteniéndose el criterio de homología de secuencia definido por Keese *et al.* (1988). Los miembros de la familia *Pospiviroidae* poseen una zona conservada central (CCR) y carecen de actividad ribozimática, por otro lado, la familia *Avsunviroidae* carece de regiones conservadas centrales, pero si mantiene un motivo conservado que le otorga la capacidad de formar estructuras con propiedades de autoclivaje en su replicación (Flores *et al.*, 1998).

Estructura secundaria

En condiciones no desnaturizantes, la mayoría de los viroides adoptan una conformación de varilla (*rod-like*), en la que regiones de elevada complementariedad se alternan con bucles formados por bases desapareadas (Riesner *et al.*, 1979). Esta estructura secundaria le confiere a la molécula del viroide ciertas características moleculares más propias de cadenas bicatenarias que de moléculas monocatenarias, por ejemplo, la capacidad de algunos viroides de mantenerse disueltos en concentraciones 2M de Cloruro de litio en contraste con las cadenas simples y poco estructuradas de ARN (Navarro y Flores, 1997). Los plegamientos característicos adoptados por los viroides se han logrado predecir mediante análisis *in silico* calculando la estructura termodinámica más estable en condiciones estandarizadas.

La Familia *Pospiviroidae*

Esta familia está constituida por 5 géneros: *Coleviroide*, *Apscaviroide*, *Cocadviroide*, *Hostuviroide* y *Pospiviroidae*, en los últimos 4 están distribuidos los viroides cítricos, representando 7 especies hasta el momento.

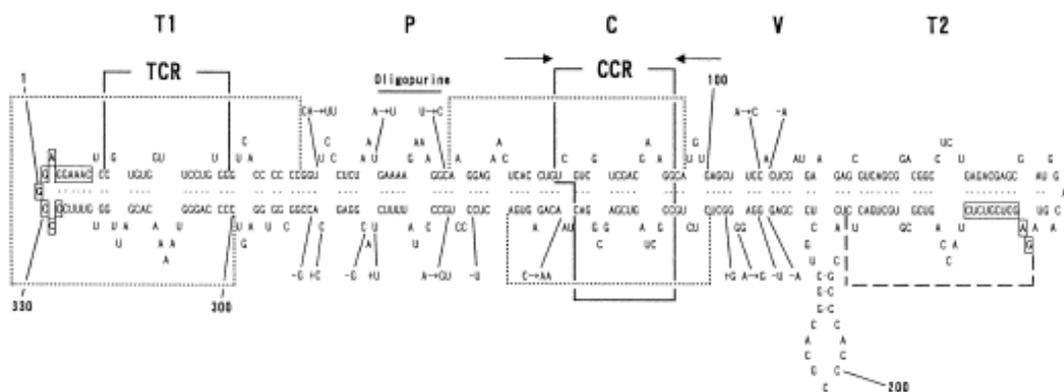
i) Dominios estructurales

La estructura de varilla es la conformación típica de los viroides de esta familia, en la cual están incorporados los viroides cítricos. En la conformación *rod-like* de la familia *Pospiviroidae* pueden identificarse cinco dominios según el modelo propuesto por Keese y Symons, (1985) (**Gráfica 1**). Como muestra este diseño, la molécula posee un dominio central (C) flanqueado a su derecha por un dominio variable (V) y a su izquierda un dominio patogénico (P). Finalmente se observan dos dominios terminales, uno en el extremo derecho de la molécula (T_R) y el otro en el izquierdo (T_L). Estas regiones mantienen una serie de motivos de secuencia conservados, los cuales juegan un rol importante en cuanto a su ciclo infectivo y una dinámica compleja con las funciones biológicas que desarrollan los viroides (Ding e Itaya, 2007).

La región conservada central (CCR) es el motivo menos variable entre los diferentes viroides de la familia *Pospiviroidae* y está formado por dos cadenas de nucleótidos del dominio C. La rama superior del CCR mantiene en sus extremos secuencias palindrómicas, las cuales forman una estructura alternativa de tipo horquilla (*harpin* HI) durante la disrupción en procesos de desnaturalización de la estructura nativa. Este motivo parece tener relevancia en el procesamiento de la molécula viroide en la replicación (Visvader *et al.*, 1985). Por otro lado Baumstark *et al.*, (1997) definió una zona de corte y ligación en la CCR, similar al bucle E conservado del ARN ribosomal eucariota, intrones tipo I y II, RNasa P y ribozimas. El bucle E viroide al ser irradiado con luz ultravioleta es capaz de entrecruzar la hebra superior e inferior de la molécula de manera covalente (elemento de estructura terciaria). Esta cualidad podría implicar a ésta zona en posibles pasos de ligación del procesamiento replicativo e interacciones ARN-ARN y ARN-proteínas (Eiras *et al.*, 2007).

La región terminal T_L posee una zona conservada que en ciertos viroides se localiza en la hebra superior y es denominada región terminal conservada (TCR). Por otro lado, esta región ubicada en el extremo del dominio terminal se designa como horquilla terminal conservada (TCH) formando una estructura metaestable. Cabe

destacar que las regiones T_L y T_R parecen estar implicadas en fenómenos de intercambio o recombinación de secuencias entre viroides de diferentes especies que coinfectan una misma planta, manteniendo un rol en el rearrreglo interno de la molécula. El estudio de estas regiones podrían ayudar a resolver planteamientos en cuanto a la evolución del genoma viroide (Semancik *et al.*, 1994). El dominio P se caracteriza por tener una secuencia rica en oligos A (5-6) consecutivos y se ha denominado como región moduladora de virulencia, ya que el cambio de algunas pocas bases puede alterar la severidad de los síntomas en una infección (Schnölzer *et al.*, 1985). Esta región podría interactuar como sitio de reconocimiento, unión de proteínas y factores del hospedero en el evento patogénico primario (Schmitz y Riesner, 1998). La región variable (V) de la molécula viroide es la zona que presenta la mayor variabilidad entre viroides cercanamente relacionados. Está involucrada en la formación de una estructura metaestable o horquilla H II (apareamiento de secuencias palindrómicas en la hebra inferior de las regiones V y T_L), produciendo una estructura con elevada estabilidad en su transición hacia la desnaturalización. En esta etapa, la estructura podría interactuar con polimerasas y con factores del hospedero (Schröder y Riesner, 2002).



Gráfica 1. Estructura secundaria del genoma ARN completo (330nt) de *CVd-VI* (*Pospiviroidae*). Se muestran los dominios estructurales Terminal izquierdo (T1), Terminal derecho (T2), Patogénico (P), Conservado (C), Variable (V) y las regiones terminal conservada (TCR) y central conservada (CCR). Tomado de Ito *et al.*, 2001.

ii) Procesos replicativos: enzimas involucradas

La replicación se realiza de forma autónoma en el nucleoplasma de las células del huésped susceptible, mediante un mecanismo de círculo rodante asimétrico. Mecanismo en el cual, la hebra de ARN dominante (polaridad +) sirve como templado para la síntesis de oligómeros lineales de secuencia complementaria (polaridad negativa), estos últimos son utilizados directamente como molde para la producción de hebras oligoméricas de polaridad positiva. Estas son procesadas a unidades

monoméricas que por autoligación se circularizan y generan una progenie circular ARN (+) (Branch y Robertson, 1984). La presencia de moléculas de ambas polaridades (intermediarios replicativos) acumulándose a distintas concentraciones fue reportada por Qi y Ding (2003), indicando una localización subnuclear diferencial. Se demostró que el ARNvd (-) y ARNvd (+) se localizan en el nucleoplasma, pero que únicamente la hebra positiva se acumula en el nucleólo. Las actividades enzimáticas necesarias para la replicación viroide mediante el círculo rodante son: una ARN polimerasa involucrada en la síntesis de oligómeros, una ARNasa que procese estas cadenas y por último una ARN ligasa que circularice las progenies. Todos estos procesos son llevados a cabo mediante la maquinaria enzimática del huésped. La enzima ARN polimerasa ADN dependiente del hospedero es la encargada de la síntesis de las hebras oligoméricas viroidales. En la célula, la RdDP es la encargada de la síntesis del ARN mensajero, sin embargo los viroides tienen la capacidad de redireccionar y beneficiarse de ésta maquinaria transcripcional, mecanismo que está aún por resolver (Schindler y Muhlbach, 1992; Flores *et al.*, 2005). Por otro lado, el descubrimiento de enzimas celulares ARN polimerasas dirigidas al ARN (RDRs) en plantas, no descarta la posibilidad de que este tipo de moléculas puedan estar también involucradas en la replicación viroidal; como por ejemplo la síntesis de una hebra viroide lineal concatamérica negativa (Ding e Itaya 2007).

iii) Movimiento del viroide en la planta.

Los viroides, como ya se mencionó, tienen la capacidad de infectar a la planta de manera sistémica, aprovechando las rutas y mecanismos celulares de tráfico a través del huésped, mediante interacciones y reconocimiento con factores celulares. El ARN de origen viroide a partir de su información estructural sería capaz de potenciar : i) el transporte al núcleo de la célula, ii) la salida del citoplasma, iii) el movimiento de célula a célula, iv) la incorporación en el tejido vascular, el tráfico a través del floema y la salida del mismo (Ding y Wang, 2009). El tráfico de los viroides de célula a célula se realiza por medio de transporte simplásmico a través de los plasmodesmos. La molécula infectiva (hebra positiva) debe colonizar las células adyacentes para luego moverse a zonas distantes de la planta. Sin embargo, debe vencer las barreras físicas que interponen los orgánulos de interconexión citoplasmática intercelular en contra del libre movimiento de moléculas. Proteínas celulares pre-existentes y complejos ribonucleoproteicos cumplen un rol regulatorio junto con motivos estructurales del

patógeno relacionados al tráfico. La vía de transporte de largas distancias que utilizan los viroides para traficar sistémicamente en la planta es el floema. Las macromoléculas como los fotoasimilados circulan por esta misma estructura vascular. No obstante, se mueven por difusión desde las fuentes hasta los sumideros, en contraposición con virus, viroides y ARN endógenos que ven facilitado su transporte mediante la unión con proteínas y factores del huésped (Takeda y Ding, 2009). Se debe destacar que las plantas poseen puntos estratégicos de regulación del paso de moléculas a ciertos tejidos. El meristemo apical es un sitio de alta actividad celular, que a su vez está restringido para la mayoría de virus y viroides. Esto corresponde a que en las proximidades de este tejido, el sistema vascular aun no se encuentra diferenciado y su acceso es exclusivamente por tráfico célula a célula. Es posible que el mecanismo que imposibilita que los viroides entren al meristemo esté relacionado con la maquinaria de silenciamiento génico post-transcripcional (Schwach *et al.*, 2005).

iv) Variabilidad de los viroides

En plantas infectadas se ha demostrado que existe una gama de secuencias de viroides que son heterogéneas y no una única variante (Visvader y Symons, 1983). Estas variantes o haplotipos se comportan siguiendo el modelo de cuasi-especies propuesto por Eigen (1993). El modelo de cuasi-especies se refiere a la distribución de genomas no idénticos pero de secuencias similares que se formaron desde un genoma único; estableciendo poblaciones de replicones cuya complejidad aumenta si la fidelidad del proceso replicativo decae (Codoñer *et al.*, 2006). El número y la frecuencia de las diferentes secuencias definen la variabilidad de una población. Dentro de esta población se encuentra una secuencia con mayor eficiencia biológica, la cual se define como maestra (coincide con la denominada secuencia consenso). Es decir, la secuencia promedio que mantiene en cada posición al nucleótido más frecuente en el espectro de secuencias de la población. Los genomas de los viroides presentan una elevada tasa de mutación, considerándose como extrema relacionada a su genoma tan reducido, debido a la ausencia de mecanismos de corrección de errores en las polimerasas implicadas en el proceso de replicación (Gago *et al.*, 2009).

Clasificación de los viroides cítricos

Los viroides se clasifican según la normativa del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), mediante el Grupo de Estudio de Viroides del Subcomité

de Virus Vegetales, en la que se diferencian familias, géneros y especies. Los viroides cítricos se ubican en la familia *Pospiviroidae*, que hasta el momento se componen de 7 especies ubicadas en 4 géneros, según los criterios de secuencia de la CCR, presencia o ausencia de TCR o TCH y las propiedades biológicas a nivel de especie (**Gráfica 2**). La identidad de secuencia inferior al 90% es el criterio para diferenciar a dos especies como distintas y ubicadas en un mismo género. Las especies deben mantener propiedades biológicas características que las diferencien, de ahí el nombre que se le asigna a cada especie según la manifestación de síntomas que provoca en huéspedes naturales. Sin embargo, no todos los viroides generan patologías, por lo que su nomenclatura sólo hace referencia a su huésped natural y se le asigna una numeración en aquellos casos en los que no está confirmada la enfermedad que provocan. El esquema actual de clasificación mantiene la propuesta de Flores *et al.* 2000, con las modificaciones recientes aceptadas por el Grupo de Estudio de Viroides de la ICTV (www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp), el cual los clasifica en siete especies, definidas como: *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, *CBCVd*, *CVd-V* y *CVd-VI*. Las características de estos viroides cítricos se detallan a continuación.

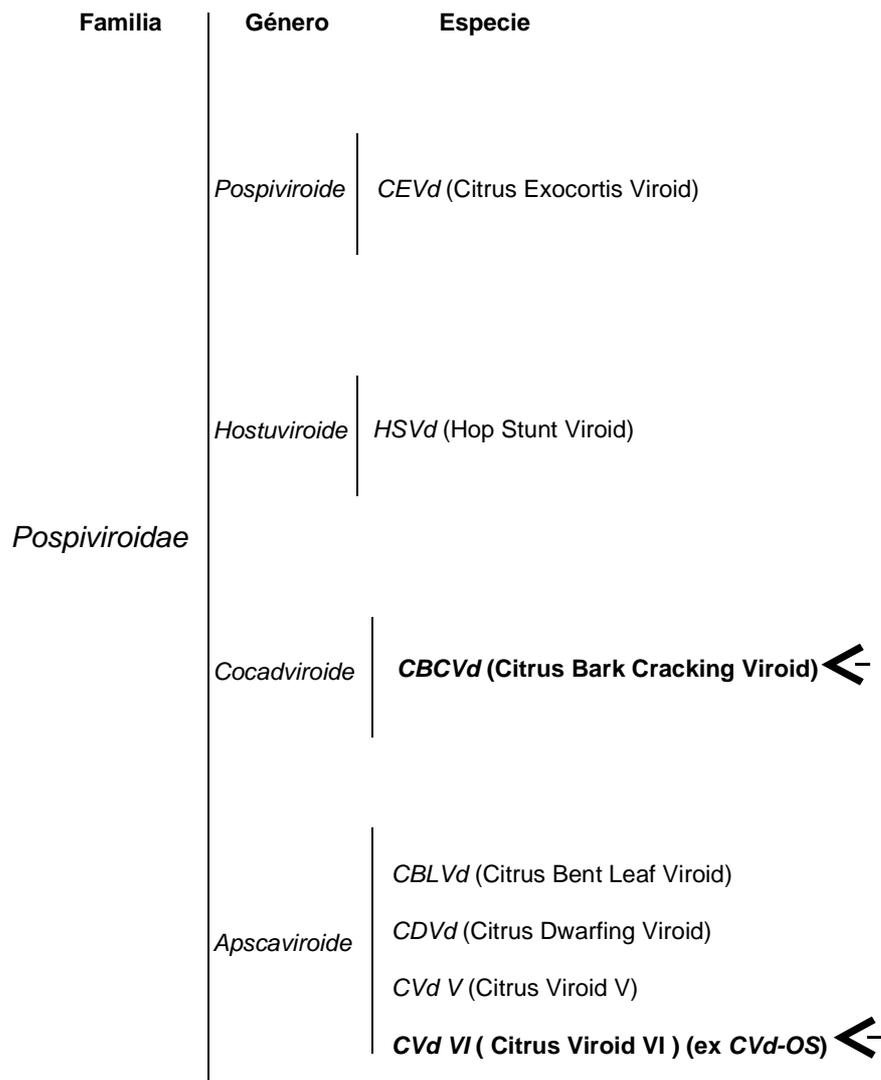
El viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd)

Se ha demostrado que *CEVd* es el agente etiológico causante de la exocortis de los cítricos, mediante la verificación de los postulados de Koch en *Poncirus trifoliata* (Vernière *et al.*, 2004). Consiste de una molécula con diferentes variantes de secuencia comprendidas entre los 371nt y 375nt. Por otro lado, se reportaron secuencias de este viroide constituidas por 463 y 467 nucleótidos, debido a la incorporación de duplicaciones de 92nt y 96nt en la región terminal derecha (TR) (Szychowski *et al.*, 2005). El brazo derecho y la zona central de la estructura molecular del viroide *CEVd* mantienen una elevada similitud de secuencia con *CBCVd*. El viroide de la exocortis de los cítricos presenta una elevada distribución mundial, lo mismo sucede con el *CDVd* (Rakowski *et al.*, 1994) y *HSVd* que exhiben una alta tasa de ocurrencia en cultivares cítricos del mundo (Ito *et al.*, 2002b; Duran-Vila y Semancik, 2003).

El viroide de la hoja curvada de los cítricos (CBLVd)

Antiguamente referido como *CVd-I*, su nombre descriptivo es referente a la patología producida en el indicador cidro Etrog. Para este agente infeccioso se han reportado dos variantes (Ia y Ib) (Duran-Vila *et al.*, 1988a), las cuales poseen un tamaño

de 327nt y 318nt respectivamente. Posiblemente, la variante CVd-Ia sea un viroide quimérico constituido por la duplicación parcial de las regiones terminales de la variante Ib. Este viroide podría haberse originado por eventos de recombinación producidos por co-infecciones con otros viroides en plantas cítricas (Foissac y Duran-Vila, 2000). El viroide *CBLVd* posee similitud de secuencia con parte de la zona terminal izquierda (TL) y Patogénica (P) de *CEVd* (Ashulin *et al.*, 1991).



Grafica 2 .Clasificación de los viroides cítricos de la familia *Pospiviroidae* según la última evaluación del ICTV (2009). Nótese la incorporación del Viroide Cítrico V (*CVd-V*) y el Viroide Cítrico VI (*CVd-VI*) como nuevas especies (Carstens, 2010), este último era citado como Viroide Cítrico Fuente Original (*CVd-OS*). Las especies en negrita e indicadas con una flecha corresponden a los viroides principales de este estudio.

Por otro lado, Rakowski *et al.* (1994) indican una similitud de secuencia entre *CDVd* y la variante b de *CBLVd*. La baja distribución y ocurrencia del viroide de la hoja curvada

de los cítricos es reportada por Malfitano *et al.* (2005), dato que se mantiene constante y refuerza la disminuída aparición de este viroide a nivel mundial.

El viroide del enanismo del lúpulo (HSVd)

HSVd fue descubierto como el agente causal del enanismo del lúpulo (Ohno, 1983). En hospederos cítricos se determinó un conjunto de variantes con similitud estructural y molecular denominadas como grupo II de los viroides cítricos (*CVd-II*) con un tamaño que oscila entre los 296 y 301 nucleótidos. Este grupo (actualmente especie) presenta dos variantes, la variante *CVd-IIa* y *IIb*, ésta última, produce una enfermedad en cítricos denominada cachexia de los cítricos y se caracteriza por presentar una secuencia específica de 6nt en la zona variable (V) de su genoma (Semancik *et al.*, 1988; Palacio *et al.*, 2004). El viroide *HSVd* presenta en su región terminal izquierda, cierta similitud de secuencia con una zona del genoma de *CBCVd*.

El viroide del enanismo de los cítricos (CDVd)

Este viroide también llamado como *CVd-III*, presenta una molécula con un tamaño entre 294-297 nucleótidos, reportándose 2 variantes (*CVd-IIIa* y *CVd-IIIb*). El nombre descriptivo a la patología refiere al enanismo generalizado que provoca en cultivos comerciales infectados. El *CDVd* acumula un 40% de similitud de nucleótidos con *CBCVd* y un 45% con *CEVd* (Rakowski *et al.*, 1994). Por otro lado, el *CVd-VI* presenta un 68% de identidad con el genoma completo del viroide del enanismo de los cítricos (Ito *et al.*, 2001).

El viroide de la corteza agrietada de los cítricos (CBCVd)

En el pasado, denominado como viroide IV de los cítricos (*CVd-IV*), es el patógeno cítrico más pequeño de ésta familia y consta de 284-286nt. El agrietamiento de la corteza fue detectado por Vernière *et al.* (2004) en el portainjerto de una variedad susceptible (*Poncirus trifoliata*), de ahí la propuesta de su nombre que describe la sintomatología de agrietamiento. Este viroide presenta gran similitud con las zonas V y TR de *CEVd* (80 a 90 residuos), por lo que fue definido como un viroide quimérico de tipo mosaico (Puchta *et al.*, 1991). Actualmente este viroide pertenece al género *Cocadviroide*, junto con el viroide cadang-cadang del cocotero (*CCCVd*) según la clasificación de Flores *et al.* (2000). Sin embargo, hay discrepancias con la categorización de *CBCVd* en este género, basadas en el relacionamiento filogenético

que presenta con algunos aislados de *CEVd*, patrones conservados entre *Pospiviroides* (región terminal repetida-TRR-) y similitud de propiedades biológicas y huésped común que mantienen *CBCVd-CEVd* (Semancik y Vidalakis, 2005). Estas discrepancias y la propuesta de reubicación de *CBCVd* en el género *Pospiviroides* fueron presentadas ante la ICTV por Vidalakis en el año 2008. Análisis de secuencia definen que el brazo derecho y la zona central de *CEVd* son similares a *CBCVd*. Por otra parte, *HSVd* en su región terminal izquierda mantiene elevada similitud con regiones estructurales de la secuencia nucleotídica de *CBCVd* (Puchta *et al.*, 1991). El *CDVd* presenta un 40% de similitud acumulada con este viroide. (Rakowski *et al.*, 1994). El viroide del agrietamiento de la corteza de los cítricos es considerado como un patógeno de baja distribución mundial presentando una disminuída ocurrencia en plantaciones cítricas, siendo reportado únicamente en España (Murcia *et al.*, 2009), Turquía (Önelge, 2010), Sudan (Mohamed *et al.*, 2009), Sultanato de Omán (Bernad *et al.*, 2005), Israel (Puchta *et al.*, 1991), Japón (Ito *et al.*, 2003), Italia (Malfitano *et al.*, 2005), Cuba (Pérez *et al.*, 2004), China (Cao *et al.*, 2010) y los Estados de California y Florida en Norteamérica (Duran-Vila *et al.*, 1988b y Garnsey *et al.*, 2002).

El viroide V de los cítricos (CVd-V)

Este patógeno fue reportado recientemente en España, obtenido de un aislado de *Atalantia citroides* (un hospedero resistente a los demás viroides cítricos) (Barbosa *et al.*, 2005a). Posteriormente, fue identificado y caracterizado en citrus determinando su tamaño en 293-294 nucleótidos. Su genoma es rico en G:C y presenta un 68% de apareamiento entre la totalidad de sus bases. Posee una CCR característica del género *Apscaviroides* y una TCR presente en otros miembros de la familia *Pospiviroidae*. Alineamientos de la secuencia completa de *CVd-V* con otros viroides, indican una identidad del 62% y 60% con *CDVd* y *CBLVd* respectivamente. A su vez, utilizando ribosondas específicas para *CDVd* se observó una leve señal en muestras infectadas con *CVd-V*, indicando una alta similitud entre regiones de éstos viroides (Serra *et al.*, 2008a y 2008b). El viroide *CVd-V* mantiene una baja distribución a nivel mundial, con una tasa de ocurrencia reducida, situación esperada debido a la reciente caracterización y reporte de ésta nueva especie. Testajes con sondas marcadas y cebadores específicos muestran su presencia en cultivares cítricos de países como EUA, España, Nepal, Sultanato de Oman (Serra *et al.*, 2008b), Irán (Bani Hashemian *et al.*, 2010), China (Cao *et al.*, 2010) y recientemente en Japón (Ito y Ohta, 2010).

El viroide VI de los cítricos (CVd-VI, ex viroide cítrico “Original Source” o CVd-OS)

Este viroide fue reportado únicamente en Japón, mantiene una estructura con un tamaño de 329-331 nucleótidos (Ito *et al.*, 2001). Su molécula presenta una CCR típica del género *Apscaviroide*. Contiene una región conservada terminal (TCR) y posee un 65% de sus bases apareadas, constituyendo una estructura secundaria de bastón con un genoma rico en G:C. El *CVd-VI* tiene una identidad del 68% con *CDVd* y presenta una elevada similitud de secuencia en sus regiones V y T_R con fragmentos nucleotídicos del genoma de *CEVd* y *CBCVd* (Ito *et al.*, 2002b). Recientemente, el viroide VI fue reconocido como nueva especie por la ICTV, previa modificación de su nombre anterior (*CVd-OS*) por ser un nombre taxonómicamente inconsistente con la reglas del comité. La distribución de esta especie es exclusivamente regional reportándose únicamente en Japón y con una baja frecuencia de aparición en plantaciones cítricas comerciales (Ito *et al.*, 2003).

Sintomatología y patogénesis

La mayoría de los viroides cítricos producen enfermedades características, de ahí el nombre de algunos de ellos que se asocian a la sintomatología desarrollada en sus huéspedes. Algunos viroides no producen síntomas en las plantas que infecta de manera natural, estos se definen como “latentes”. En relación a lo anterior, es importante discernir las asociaciones viroide-huésped como determinantes, en muchos casos, de la severidad de la infección. En ciertas variedades cítricas infectadas por viroides, los síntomas pueden ser agresivos o hasta letales (el caso de *CEVd* infectando trifoliados y cidros) o bien, el patógeno se puede comportar como latente y no generar síntomas en otras variedades cítricas (huéspedes o variedades tolerantes) (Duran-Vila y Semancik, 2003). No todos los viroides cítricos han sido reportados en cultivares domésticos, también fueron detectados en plantas ornamentales y silvestres como tomate (Verhoeven *et al.*, 2004), *Impatiens sp*, *Verbena sp* (Bostan *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006 y 2009) y 12 especies de malezas (Matousek *et al.*, 2007). Indicando el amplio espectro de reservorios que poseen estos patógenos manteniéndose en hospederos alternativos. En cuanto a la expresión de la enfermedad, los virus y viroides comparten similitudes en los síntomas que generan en plantas. Esto acarrea la dificultad de distinción entre estos agentes infecciosos mediante observaciones a campo y la necesidad de poseer huéspedes experimentales que generen síntomas más evidentes

debido a la elevada acumulación del patógeno en sus tejidos. Un ejemplo de variedad experimental que potencia los síntomas de los viroides cítricos, siendo un genotipo seleccionado por su sensibilidad y utilizado para bioensayos, es el clon 861-S1 de cidro Etrog (*Citrus medica*) (Roistacher *et al.*, 1977). La inoculación del patógeno en esta planta genera síntomas agudos como un marcado enanismo, a nivel foliar se observa epinastía severa, necrosis del peciolo y nervadura central. Desde la perspectiva molecular, los viroides de la familia *Pospiviroidae* generan efectos patológicos por interacciones directas entre su molécula y componentes celulares del huésped, hasta el punto de producir anomalías en la pared celular y malformaciones en los cloroplastos de la planta infectada (Wang *et al.*, 1986). Se presume que la aparición de síntomas, como punto final del ciclo infeccioso del patógeno, esta mediada por una serie de eventos en cascada relacionados al incremento en la expresión de proteínas de defensa PR asociadas al mecanismo de resistencia sistémica adquirida (SAR). Estas proteínas y ARNs endógenos interactuando con la molécula del viroide podrían ser los efectores directos de la patogénesis (Conejero *et al.*, 1990). Generalmente la patogenicidad o intensidad de los síntomas no es proporcional al título o acumulación del viroide en el huésped, sino la variante patogénica (razas severas, moderadas y suaves) que infecte el tejido. A su vez, esta variante recurre a modificaciones en la geometría molecular de sus motivos estructurales y desarrolla interacciones con proteínas de la planta (Rodio *et al.*, 2006). Por otro lado, los mecanismos de defensa de la planta mediante procesos de silenciamiento post-transcripcional (PTGS) podrían intervenir frente a una infección por viroides (ARN exógeno), provocando la aparición de siRNA viroides (Papaefthimiou *et al.*, 2001). La génesis de estos “*small interfering*” ARN derivados de viroides (vd-siRNAs) podría deberse a un intermediario nuclear dsARN formado en el núcleo por la replicación del patógeno, este ARN doble hebra (dsARN) es un candidato para ser procesado por una isoenzima tipo Dicer (DCL) y posteriormente acoplado al complejo RISC (RNA-Induced Silencing Complex) en busca de ARNs con homología de secuencia (Markarian *et al.* 2004; Flores *et al.*, 2005). Sin embargo, la molécula viroide mantiene una estructura secundaria similar a la de un pre-micro ARN y perfectamente lograría ajustarse como sustrato de enzimas tipo Dicer (Itaya *et al.*, 2007). Este micro-ARN generado y acomplexado con RISC podría actuar sobre intermediarios replicativos del viroide y ser susceptible a la degradación. En contraposición con lo anterior, Gómez y Pallás (2007) proponen que los viroides pueden ser resistentes a la degradación mediada por silenciamiento del ARN. Esto podría involucrar a su estructura secundaria

compacta (le confiere resistencia a ARNasas) evitando la complementariedad con siARN mediado por RISC. Por otro lado, la resistencia a la degradación también se explicaría mediante compartimentalización, es decir, mientras las formas viroidales susceptibles se localizan en el núcleo, el complejo RISC se ubica en el citoplasma en donde las formas maduras del viroide transitan, escapando así de las defensas del huésped (Denti *et al.*, 2004). Se sugiere que los viroides pueden alterar los patrones de expresión de genes del hospedero a nivel transcripcional y post-transcripcional (patogénesis mediada por siRNA) y no afectar la regulación de la expresión traduccional o post-traduccional, dando como resultado la patología (Gora-Sochacka, 2004). Sin embargo, estos mecanismos de patogénesis aún no están claros. Recientemente, fue propuesto un abordaje que explica la patogénesis desde i) la activación de cascadas de señalización conteniendo quinasas activadas por vd-siRNAs (*viroid-small interfering RNAs*) y ii) la intervención de *trans-acting* vd-siRNA en la degradación de ARN mensajero del hospedero. Estos procesos lograrían la pérdida o ganancia de función a nivel proteico o transcripcional generando perturbaciones en la defensa vegetal y las vías de señalización de hormonas (Owens y Hammond, 2009)

Transmisión y propagación de los viroides cítricos

Los viroides cítricos no presentan transmisión mediante ningún vector, pero no se descartan los áfidos, pulgones, moscas o abejas como ruta de infección (Antignus *et al.*, 2007). Los viroides raramente son transmitidos por polen o semillas en citrus, sin embargo, recientemente se detectaron semillas de plantas ornamentales que mantenían el genoma de *CEVd*. Los plantines analizados y derivados de estas semillas presentan resultados positivos para *CEVd*, confirmando su posible transmisión por semillas. (Singh *et al.*, 2009). Por otro lado, Cohen *et al.* (2005), reporta la dispersión mecánica de los viroides desde animales que usan como plataforma de transmisión su cornamenta, la cual podría portar un inóculo del patógeno obtenido por fricción con plantas de citrus infectadas experimentalmente. Los viroides mantienen una elevada estabilidad en extractos de savia de plantas infectadas, por lo que pueden ser fácilmente transmitidos de manera mecánica por prácticas agronómicas como poda, cambio de copa y cosecha. Los viroides poseen un alto grado de tolerancia al calor y resistencia a tratamientos químicos, por ello, la desinfección de herramientas contaminadas se hace difícil. Sin embargo, un tratamiento con agentes oxidantes, como hipoclorito de sodio, ha demostrado ser eficaz como desinfectante y recomendado en prácticas de poda y

manipulación en viveros (Brlansky y Timmer, 2010). Estudios de transmisión mecánica de viroides cítricos en plantas a campo muestran que aproximadamente un 10% de las plantas testadas fueron infectadas por viroides al aplicar cortes con herramientas contaminadas (Barbosa *et al.*, 2005b). Estos resultados revelan una ruta importante en la propagación de enfermedades de etiología viroide. La vía de mayor relevancia y eficiencia en la transmisión de viroides cítricos es la propagación vegetativa de material infectado. Las prácticas de injertación de yemas varietales para obtener plantas madre es una de las responsables de la diseminación mundial de viroides. Una vez establecida la infección en bloques de producción y distribución de material vegetal, la propagación se torna descontrolada y silenciosa hasta que los bloques no sean chequeados con una batería diagnóstica y sean objeto de Programas de Saneamiento (Duran-Vila y Semancik, 2003)

Expresión de síntomas de los viroides cítricos

Los síntomas en plantas infectadas están influenciados por la virulencia del aislado y/o la variante patogénica, el estado nutricional del huésped y la variedad cítrica. Este último es un factor determinante en la expresión de síntomas, ya que un mismo aislado puede actuar como una infección latente en determinadas variedades cítricas (pasando desapercibido) y ser agresivo en otras. Las variedades cítricas sensibles a viroides y utilizados mundialmente como portainjertos son la lima “Cravo” o Rangpur (*Citrus limonia Osbeck*), híbridos del grupo de los citrange (*Citrus x sinensis x Poncirus trifoliata*) y *Poncirus trifoliata* con sus variantes. Estos presentan los síntomas más agresivos a campo cuando son infectados con *CEVd*, mostrando la típica patología de exocortis: descortezado (levantamiento de la corteza formando escamas de tamaño variable) y acompañado de un enanismo severo. Los síntomas son observados entre 4 a 12 años dependiendo de las condiciones del cultivo y la variedad infectada. El *CEVd* cuando es hospedero de propagaciones clonales de cidro Etrog (una planta sensible utilizada como bioamplificador del título viroide para diagnóstico biológico) manifiesta un fuerte enanismo y epinastía muy marcada, acompañada de necrosis en el nervio central de la hoja. En este huésped la infección puede llegar a ser letal. (Calavan *et al.*, 1964; Duran-Vila *et al.*, 1988a). En plantaciones cítricas, los viroides pueden co-infectar a una misma planta, esto produce una serie de interacciones entre diversas combinaciones de viroides generando efectos sinérgicos o antagónicos en cuanto a sintomatología (Vernière *et al.*, 2006). Se observa que en plantas co-infectadas con

CEVd y *CBCVd* se produce un efecto antagónico y los síntomas característicos de exocortis son mermados, lo que deriva de una posible relación biológica entre estos dos viroides. Ito *et al.* (2002a) reporta que la infección múltiple de cidro con *CBLVd*, *CDVd* y *CBCVd* injertado sobre *Poncirus trifoliata* produce una sintomatología tipo exocortis, indicando efectos sinérgicos. Esta observación concuerda con el descamado de la corteza del naranjo trifoliado como portainjerto de Clementinas infectadas con la misma combinación de viroides y en ausencia de *CEVd* / *HSVd* (Vernière *et al.*, 2006). El viroide del enanismo del lúpulo (*HSVd*) presenta una enfermedad característica en *Citrus macrophylla*, tangelos y mandarinos, denominada cachexia. Se observan hendiduras en la madera que se corresponden con heridas en la cara cambial de la corteza, acompañadas de una decoloración del floema y de exudaciones gomosas. Las plantas sensibles en estadios avanzados de la enfermedad pueden mostrar clorosis foliar, enanismo, canchales en el tronco-ramas y eventualmente producir la muerte de la planta (Reanwarakorn y Semancik, 1999). Por otro lado, se reportó un efecto sinérgico entre *HSVd* y *CBCVd* observándose un potenciamiento de los síntomas, pero este efecto decae si la planta se reinfecta con viroides adicionales (Vernière *et al.*, 2006). La mayoría de variedades cítricas se muestran como tolerantes frente al viroide *CBLVd*, sin embargo en cidro Etrog los síntomas característicos son aparición de necrosis puntuales en el nervio central de las hojas, la cual induce una intensa curvatura en la hoja (síntoma que da nombre al viroide). Se ha demostrado que plantas infectadas con *CEVd* y coinoculadas con aislados de *CBLVd* potencian su sintomatología característica de exocortis mediante efectos sinérgicos, favorecido este efecto con la adición de otros viroides en la co-infección (Vernière *et al.*, 2006). El *CDVd* genera en cultivares como naranja Valencia sobre *Poncirus sp*, un enanismo generalizado, reducción significativa del tronco y reducción del volumen de la copa. Este viroide co-inoculado con *CEVd* potencia la sintomatología de achaparamiento en plantas infectadas. El viroide *CBCVd* presenta síntomas característicos en variedades de Clementinas injertadas sobre *Poncirus trifoliata*, provocando un agrietamiento severo en el tronco. Se demostró un consistente efecto sinérgico en plantas co-infectadas con *CBCVd* y *HSVd*, a su vez un efecto antagónico entre *CBCVd* y *CEVd* atenuando los síntomas inducidos por este último (Vernière *et al.*, 2006). Las evaluaciones de las propiedades biológicas de *CVD-V* respecto a los síntomas producidos en plantas de cidro, mostraron un leve enanismo, necrosis de las nervaduras y agrietamiento de las ramas. Mediante inoculaciones con viroides del mismo género (*CBLVd* y *CDVd*) se observaron efectos sinérgicos y un

incremento en la severidad de los síntomas de enanismo, necrosis y epinastía severa (Serra *et al.*, 2008a). El viroide VI de los cítricos presenta síntomas suaves de epinastía y necrosis de los peciolos en cidros infectados, además, podría comportarse sinérgicamente con otros viroides provocando una sintomatología tipo exocortis en este mismo huésped (Ito *et al.*, 2002a). No se reportaron síntomas en mandarina Satsuma (variedad en el que fue inicialmente detectado el *CVd-VI*). Sin embargo, recientemente se detectó el viroide VI en árboles de kaki (*Diospyrus kaki Thunb*) o “*Japanese persimmon*” comprobándose su transmisión por injerto de kaki a kaki y la posibilidad de que ésta variedad sea huésped natural de éste viroide (Nakaune y Nakano, 2008).

Rendimientos de cultivares cítricos infectados con viroides.

Las plantaciones cítricas infectadas mediante combinaciones de viroides o inoculadas con viroides únicos, presentan diferentes irregularidades en su crecimiento, rendimientos en la cosecha y la calidad de los frutos. Las variedades cítricas comerciales como Clementinas (*Citrus clementina* “Nules”) y naranja dulce (*C. sinensis* “Navelina”) en portainjertos Carrizo citrange (*Poncirus trifoliata* x *C. sinensis*) afectadas por infecciones múltiples, sufren de una disminución en el tamaño de las plantas o enanismo severo (asociado al pobre desarrollo del sistema radicular), reducción de la circunferencia del tronco y el volumen de la copa (Bani Hashemian *et al.*, 2009). Observaciones similares son reportadas por Vernière *et al.* (2004) en Clementinas injertadas en un pie de *P.trifoliata*. En este contexto, es evidente la disminución del crecimiento vegetativo en plantas infectadas con viroides independientes (*CEVd* y *CDVd* principalmente) presentando reducciones en el rendimiento acumulativo en el transcurso de varios años en comparación con controles sanos. Situaciones equivalentes ocurren en pomelo (*Citrus paradisi* Macf.) injertado sobre naranja trifoliada (Sanches Stuchi *et al.*, 2007), Washington navel sobre Citrange Troyer (Roistacher *et al.*, 1995), limones Lisbon y Eureka injertados sobre *P trifoliata* (Broadbent *et al.*, 1988) y limón Lapithou sobre naranjo amargo. Este último presenta un efecto substancial en el crecimiento de las plantas (disminución aproximada de un 50%) en los primeros 3-8 años de edad en comparación con plantas libres de viroides (Kyriakou *et al.*, 2005). Reportes de parámetros afectados por infecciones con viroides como la producción en la cosecha, los rendimientos y la calidad de la fruta son relevantes para el rubro cítrico mundial. En este entorno, árboles inoculados con viroides producen menos fruta y una baja en la productividad anual de la cosecha

(Sanches Stuchi *et al.*, 2007). Este mismo escenario es planteado por Kyriakou *et al.* (2005), el cual reporta que el número de frutos y el rendimiento anual de la cosecha se vió reducida. El mismo autor indica que para limón Lapithou, el peso del fruto y su contenido de jugo no es seriamente afectado. Sin embargo, los solidos solubles totales y la acidez son consistentemente más altos en frutos de plantas libres de viroides. Es decir, en plantas enfermas, el índice de calidad de la fruta (coeficiente de ácidos solubles totales entre ácidos totales) se nota afectado. Una observación similar es planteada por Bani Hashemian *et al.* (2009), indicando que la densidad del jugo, la cantidad de sólidos solubles y la acidez del fruto de plantas infectadas es menor que las plantas sanas de Clementinas y Navelinas. Por último, reportes sobre la cantidad y composición de aceites esenciales extraídos por hidrodestilación de hojas/cáscaras de frutos de cidro infectados/no infectados por viroides y posterior análisis de su composición mediante cromatografía gaseosa; muestran que la cantidad de aceites esenciales extraídos de hojas sanas es mucho mas alto que en plantas infectadas (reducción en el contenido). Sin embargo, la cantidad de aceite extraído de la cáscara no presentó diferencias significativas entre sano y enfermo. Las concentraciones de ésteres y aldehídos fueron globalmente diferentes en cáscaras de frutos de plantas enfermas, observándose pronunciadas alteraciones en la composición de los aceites en la cáscara debido a la infeccion con viroides (Vekiari *et al.*, 2002).

Métodos de detección y diagnóstico de viroides

Los métodos de diagnóstico de enfermedades causadas por patógenos subvirales han tomado importancia a nivel mundial, ya que el estudio de viroides en cítricos ha incrementado y el conocimiento de los mismos revela su complejidad en cuanto a sintomatología, agresividad de las enfermedades por interacciones sinérgicas, relaciones entre variedad cítrica-patógeno, la gama de huéspedes y la posibilidad de recombinación que tienen estos agentes infecciosos. La constatación de infecciones por viroides en cultivares mediante métodos diagnósticos encuentra relevancia debido a las posibles repercusiones económicas en el rubro, dada la comprobación de los bajos rendimientos de las plantas infectadas con viroides en cultivares comerciales, afectando directamente la producción. Las consecuencias que padecen los países con un deficiente Programa de Saneamiento, Cuarentena y Certificación son las posibles restricciones fitosanitarias en cuanto a exportación y tránsito de material de propagación. El diagnóstico de

infecciones por viroides tiene diferentes limitaciones debidas a la estructura molecular del patógeno (no posee cápside proteica siendo imposible el empleo de métodos inmunológicos de detección), su fuerte apareamiento intramolecular, el comportamiento de los viroides en cuanto a su acumulación en los tejidos y los bajos e irregulares títulos de partículas en variedades infectadas (Palacio *et al.*, 1999; Barbosa *et al.* 2002). Recientemente han sido desarrollados métodos moleculares de diagnóstico de viroides basados en la detección del genoma completo del patógeno. Estos métodos buscan la independencia de los ensayos biológicos (consumen largos periodos de tiempo) y mejorar la sensibilidad, especificidad, exactitud diagnóstica, tiempos de manipulación (sin afectar la eficiencia de la técnica), la utilización de productos de baja toxicidad y no radiactivos. (Cohen *et al.*, 2006; Bernad y Duran-Vila, 2006; Murcia *et al.*, 2009). Los métodos diagnósticos de infecciones causadas por viroides cítricos se clasifican en biológicos y moleculares, según el uso de plantas indicadoras o la detección directa / indirecta del genoma del patógeno.

Métodos Biológicos: bioamplificadores de viroides

Se basan en la utilización de huéspedes alternativos sensibles que acumulan en mayores concentraciones al patógeno, provocando una serie de síntomas característicos que indican la presencia viroide. La planta indicadora comúnmente utilizada para diagnóstico de viroides cítricos es el clon 861-S1 de cidro Etrog (*Citrus medica*), la cual induce sintomatología foliar característica frente a infecciones viroidales. Sin embargo, los bioensayos presentan problemas en cuanto a la especificidad del viroide por diagnosticar, ya que este método determina si existe infección pero no cual especie es el agente causal de la patología en la muestra analizada (Duran-Vila *et al.*, 1991). Las interacciones (sinergismo-antagonismo) entre complejos de viroides co-infectando una misma planta son comunes, distorsionando los síntomas característicos y alterando el diagnóstico visual basado en síntomas foliares esperados para una especie viroide puntual. Los métodos biológicos poseen la particularidad de ser técnicas de diagnóstico con largos periodos de incubación (3-18 meses) de la planta testada en condiciones controladas de luz y temperatura (30°C-32°C), lo que transforma a este ensayo en lento y costoso. Sin embargo, al emplear una metodología mixta que combine el indexaje biológico y el uso de técnicas moleculares se consigue una aproximación diagnóstica más confiable que la obtenida con el método biológico convencional (Duran-Vila *et al.*, 1993). Es de importancia destacar que Kapari-Isaia *et al.* (2008) propone una estrategia

alternativa al diagnóstico biológico convencional con cidro Etrog, la cual combina micro inyección *in vitro* con indexaje biológico. Esta alternativa brinda un diagnóstico de presencia/ausencia de viroides entre 12-20 días después del micro-indexaje en una micro-estaca de cidro cultivada *in vitro*.

Métodos Moleculares: detección del genoma viroide

Detección directa de ARN viroide: electroforesis secuencial

Esta técnica está basada en la separación electroforética del ARNvd del ARN total extraído del tejido infectado mediante geles de poliacrilamida en condiciones nativas y posteriormente desnaturalizantes (sPAGE o “secuencial”), con pH discontinuo para potenciar la resolución de los ARNs viroides en sus formas circulares y lineales (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986). Esta técnica diagnóstica permite separar el complejo de formas circulares-lineales del ARNvd. Este complejo se comporta electroforéticamente como ADN lineal doble hebra en geles PAGE, lo que facilita la caracterización de su tamaño molecular y la comparación con muestras de referencia. Esta metodología permite visualizar de manera directa, mediante tinción de plata, los viroides presentes en un huésped cidro previamente inoculado. Sin embargo, este tipo de diagnóstico presenta tiempos extensos de electroforesis, dificultades de manipulación, necesidad de controles positivos de viroides en plantas cidro independientes y baja sensibilidad en cuanto al uso en plantas de especies y variedades comerciales. De tal manera, su uso como método de detección de rutina en Programas de Certificación es tedioso y poco confiable (Palacio *et al.*, 1999).

i) Extracción de ARN viroide

El diagnóstico molecular de viroides que implique la amplificación enzimática del genoma del viroide o mediante la detección por técnicas de hibridación ARN-ARN o ARN-ADN requiere contar con ARNvd de buena calidad. Lo que conlleva que, el punto de partida para un diagnóstico efectivo, se dirija a una extracción de ARN vegetal enriquecido con el patógeno y en conjunto con una técnica de detección molecular apropiada. Existe una gran variedad de protocolos de extracción de ARN para la detección de viroides, los cuales son dependientes al tipo de huésped y el tejido analizado. Sin embargo, no hay un método de extracción general para la recuperación de viroides en una planta infectada. El método de extracción debe ser ajustado según sea la herramienta molecular de diagnóstico seleccionada, para ello se debe tener en cuenta

la concentración del patógeno en la variedad cítrica (y con esto la sensibilidad de la técnica), el tejido específico, los residuos contaminantes como polisacaridos-polifenoles que permanecen después de la extracción (Nakahara *et al.*, 1999) y los tiempos de manipulación contra la calidad del ARN. Para ensayos de rutina se deben analizar muchas muestras vegetales con una técnica que posea una elevada confiabilidad en el resultado y que defina la presencia/ausencia del patógeno. Varios autores reportaron la utilización de diversos métodos de extracción de ARNvd, utilizando como tejido vegetal hojas/peciolos de cidro Etrog y hojas/ramas de plantas de variedades comerciales, obteniendo resultados variables según la herramienta molecular de diagnóstico empleada (Noronha Fonseca *et al.*, 1996; Ito *et al.*, 2002b; Palacio *et al.*, 2000; Bernad y Duran-Vila, 2006; Murcia *et al.*, 2009). Los métodos de extracción empleados en el diagnóstico de viroides tratan de obtener ARNvd con ciertas características en cuanto a pureza y concentración, o buscan evadir procedimientos tediosos y costosos. De manera comparativa se detallan algunos criterios con el objetivo de seleccionar una técnica conveniente: **i)** obtención de un elevado título del patógeno y bajos niveles de contaminantes o ARN de alto peso molecular que interfiera en los ensayos diagnósticos. Lo anterior se consigue utilizando gran cantidad de tejido vegetal de una zona de la planta en la cual el viroide transita y permanece (Semancik *et al.*, 1975). El método de extracción viroide convencional emplea homogenizadores automáticos, bombas de vacío, fenol-mercaptoetanol para romper las membranas celulares y separar las proteínas de los ácidos nucleicos, columnas de celulosa para purificar el ARN y capturar inhibidores enzimáticos (Semancik, 1986). Son frecuentes y necesarios para este método procesos de diálisis y partición con Litio para purificar-separar fracciones de alto peso molecular. **ii)** no recurrir ni a pulverizaciones ni homogenización del tejido evitando la liberación de inhibidores, para obtener ARN sin contaminantes pero con concentraciones bajas del patógeno. Evitar el uso de reactivos orgánicos de alta toxicidad y evitar la contaminación cruzada. Un ejemplo, es el método basado en los reactivos SDS/Acetato de Potasio (Cañizares *et al.*, 1998). **iii)** conseguir ARN total del material vegetal con alto grado de pureza, de manera rápida y fácil, mediante *kits* comerciales. La utilización de estos *kits*, conteniendo reactivos en base a tiocianato de guanidina/ fenol permiten la recuperación de todas las fracciones de ARN del tejido analizado, incluido el ARNvd. Un ejemplo es el reactivo TriPure[®] combinado con el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (1987). Este reactivo produce la disrupción de células y la desnaturalización de nucleasas endógenas manteniendo la

integridad del ARN. **iv)** obtención de ARNvd en pocos pasos, logrando concentraciones del patógeno detectables mediante técnicas moleculares en las que, los contaminantes, no sean el factor limitante para el desempeño de la técnica. El método Formaldehído/SSC:Fenol/Cloroformo (International Potato Center, 1997) utiliza reactivos desnaturalizantes y soluciones de alta fuerza iónica para la disrupción celular, junto con reactivos tóxicos que separan complejos ribonucleoproteicos

ii) Transcripción reversa y amplificación por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación del ADN en condiciones *in vitro*. Es necesario conocer la secuencia que se quiere sintetizar y así diseñar cebadores específicos flanqueantes de la zona de secuencia conocida. Esta herramienta molecular es capaz de detectar mínimas cantidades de ARN por su gran sensibilidad y presenta la facilidad en el procesamiento de un gran número de muestras en un corto tiempo. Esta se ha utilizado ampliamente para el diagnóstico de viroides en sus diversas variantes como la RT-PCR en tiempo real, RT-PCR en tiempo final en un paso y múltiplex (Yang *et al.*, 1992; Ragozzino *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009; Tessitori *et al.*, 2004). Sin embargo, a pesar de que esta herramienta molecular es considerablemente exitosa para fines de clonación y secuenciamiento, la RT-PCR presenta diversos inconvenientes en cuanto a la utilización en Programas de Certificación: **i)** La dificultad de optimización de la reacción PCR, ya que algunos viroides del mismo género presentan una elevada similitud de secuencia en la CCR (zona utilizada para el diseño de la mayoría de los cebadores). Razón por lo que es necesaria una temperatura de hibridación elevada para evitar apareamientos imperfectos. En cuanto a la generación de ADNc en la transcripción reversa, los viroides poseen una estructura secundaria con fuerte apareamiento intramolecular, esto conlleva a una renaturalización y reestructuración de la molécula del viroide a bajas temperaturas de transcripción provocando amplicones de tamaños no esperados (Nakahara *et al.*, 1998a) **ii)** La permanencia de inhibidores de la reacción RT-PCR derivados de la extracción de ARN, como compuestos fenólicos y polisacáridos (típicos de la pared celular en tejidos cítricos). Este punto puede ser crítico, ya que plantas infectadas pueden generar falsos negativos provocando una limitación en cuanto a la integración de esta técnica como herramienta de diagnóstico rutinario en Programas de Certificación y Cuarentena (Bernad y Duran-Vila, 2006; Sieburth *et al.*, 2002) **iii)** Amplificaciones inespecíficas generadas en las reacciones RT-PCR de material cítrico

infectado y mayoritariamente en material obtenido directamente de campo. En estas reacciones, los amplicones esperados permanecen acompañados de fragmentos de alto y bajo peso molecular, provocando confusión en la validez del resultado diagnóstico (Navarro *et al.*, 1998; Eiras *et al.*, 2009).

iii) Técnicas de detección basadas en Hibridaciones Moleculares.

La estrategia de hibridación molecular se basa en la capacidad de desnaturalización-renaturalización de los ácidos nucleicos y su unión con hebras complementarias. Los fragmentos de ácidos nucleicos complementarios a la secuencia problema (en este caso el ARNvd) se denominan sondas, las cuales pueden ser de ARNc o ADNc. Las sondas son ácidos nucleicos de hebra simple que reconocen y se ensamblan (hibridan) a la secuencia problema (viroide). La ausencia o presencia de moléculas híbridadas (sonda:ARNvd) puede detectarse por quimioluminiscencia, colorimetría o actividad radiactiva, para lo cual la sonda es marcada previamente a la etapa de hibridación. Resultados satisfactorios mediante hibridaciones moleculares dirigidas para el diagnóstico de viroides dependen en gran manera de una exitosa asociación de la sonda con la molécula del viroide; para ello, la molécula de ARNvd debe presentarse desplegada. Por lo tanto, tratamientos con calor y reactivos desnaturalizantes que provoquen rompimiento de los puentes de hidrógeno de las cadenas de ácidos nucleicos afectando los apareamientos intramoleculares son importantes en el desempeño de la técnica (Murcia *et al.*, 2009). El tipo de sondas empleadas para el diagnóstico de viroides son las constituidas por una molécula de ARN copia o de ADN copia, las cuales pueden ser marcadas (para su detección) mediante radio isótopos o por agentes intercalantes no isotópicos, como la digoxigenina. Las sondas de ADNc marcadas con DIG-11-UTP son ampliamente utilizadas por su facilidad de manipulación y rapidez de síntesis (mediante PCR de plásmidos recombinantes), no son radiactivas, no necesitan de equipos ni protección especial y no son contaminantes. Por otro lado, el empleo de sondas ARNc marcadas con el isótopo ³²P son utilizadas con frecuencia en análisis de pequeños ARNs viroides o intermediarios replicativos. Las hibridaciones moleculares poseen diferentes variantes metodológicas: según el tipo de ácidos nucleicos a detectar, si se siembran directamente en membranas cargadas o si son separados en geles de poliacrilamida / agarosa previo a la detección. Estas variantes se definen como Dot blot, Northern blot o Southern blot, siendo estas técnicas de uso frecuente para el análisis y estudio de viroides.

Hibridaciones ARN Dot Blot.

Esta técnica se basa en la siembra directa de ARN en membranas con carga positiva y posterior hibridación. El empleo de ésta herramienta promueve una gran facilidad en el tratamiento de muchas muestras y de forma rápida en cuanto a manipulaciones, siendo una metodología atractiva para el testaje en Programas de Certificación (Noronha Fonseca *et al.*, 1996; Cohen *et al.*, 2006). Sin embargo se han reportado con esta técnica resultados erráticos y falsos positivos en el diagnóstico directo en plantas de campo (sin un pasaje previo por cidro Etrog) lo que hace poco confiable a esta técnica cuando es aplicada directamente en material vegetal obtenido de cultivares comerciales (Palacio *et al.*, 2000; WenXing *et al.*, 2009).

Hibridaciones Northern blot y Southern blot.

Esta herramienta molecular permite la detección de ácidos nucleicos previamente movilizados por electroforésis y posteriormente tratados con sondas marcadas. La ventaja de este tipo de hibridaciones es la resolución del complejo de ácidos nucleicos mediante movilidad electroforética. En el caso del método Northern blot, el ARN total extraído del tejido infectado es inicialmente migrado por electroforesis de poliacrilamida. Posterior a esta separación, los ARN viroides se ubican espaciados de los grandes complejos de ARN del hospedero, de acuerdo a su tamaño relativo, evitando la interferencia de proteínas o de ARN no patógeno en las reacciones de hibridación con una sonda que corresponde al genoma completo del viroide. El ARN o proteínas podrían provocar posibles resultados erráticos, competencia por la sonda o ruido de fondo en el resultado final. La técnica de hibridación Northern es capaz de detectar pequeñas cantidades de ARNvd en material vegetal de campo infectado y discriminar entre las diferentes especies de viroides cítricos presentes, generando resultados confiables y consistentes como los expuestos por Murcia *et al.* (2009). Estos autores proponen que la técnica Northern blot es una estrategia de hibridación aplicable en Programas de Saneamiento, Mejora Fitosanitaria, Cuarentena y Certificación con una alta sensibilidad y eficiencia, combinada con las sondas de ADNc viroide disponibles en la actualidad. En el caso del método Southern blot, los fragmentos de ADN doble cadena del genoma viroidal obtenidos por RT-PCR y migrados por electroforesis son hibridados con sondas ADNc o ARNc marcadas con DIG. Esta herramienta es de gran utilidad para la validación de los diferentes amplicones generados en la transcripción reversa (Saade *et al.*, 2000). El Southern blot brinda la posibilidad de dilucidar las

interacciones de las diferentes sondas elaboradas frente a fragmentos con similitud de secuencias, regiones complementarias a la sonda ubicadas de manera discontinua en las hebras y la eventualidad de apareamientos imperfectos ADN:ADN e hibridación cruzada entre ADNs doble hebra. Estos últimos aparecen como eventos de diversa ocurrencia (Miller *et al.*, 2002). Un análisis *in silico*, rápido y comparativo mediante el programa *BLAST2 Sequences* (Tatusova y Madden, 1999), permite resolver los posibles alineamientos locales entre dos secuencias de bajo peso molecular (genoma viroide y sonda viroide). Lo que podría explicar posibles señales en ensayos de interacción de las sondas frente a genomas viroides cítricos por hibridaciones Southern blot.

La sensibilidad, especificidad y eficiencia de las sondas, en conjunto con la técnica aplicada para la detección, son puntos relevantes para el desarrollo de herramientas moleculares que tengan como objetivo el diagnóstico de rutina de la presencia de estos patógenos en cultivares comerciales. Diferentes autores han reportado la sensibilidad que presentan las hibridaciones moleculares con sondas no radioactivas cuando son aplicadas para el diagnóstico de virus y viroides en material vegetal con diferentes títulos del patógeno (Li *et al.*, 1995; Nakahara *et al.*, 1999 y 1998b). La sensibilidad es un parámetro determinante en la implementación de metodologías diagnósticas, en especial para Programas de Cuarentena o en casos críticos de exportación-importación. La sensibilidad define la proporción del total de verdaderos positivos identificados entre las plantas infectadas, y a su vez, determina los límites de detección (mínimo y máximo título de viroides que son detectables en una muestra) y los puntos de corte que establecen el nivel umbral de la señal para la asignación de presencia/ausencia del patógeno en una muestra analizada (Rodríguez *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2007). El nivel de especificidad del método diagnóstico frente a viroides cítricos no es un punto crítico en Programas de Saneamiento o Certificación; sin embargo, es un estimador evaluativo de la capacidad diagnóstica de la técnica. Una herramienta molecular que logre discriminar especies viroides que infectan una planta, genera confiabilidad para su uso en abordajes de rutina con sondas mixtas. Una robusta especificidad de la técnica permite evitar la incidencia de falsos positivos debida a posibles reacciones cruzadas entre la sonda y los ácidos nucleicos del hospedero. Además, un método de alta especificidad permite desarrollar análisis de ocurrencia y distribución de estos patógenos en una región citrícola, ya que determina específicamente cual o cuales viroides infectan un conjunto de plantas problema.

Para el desarrollo, optimización e implementación de ensayos moleculares con fines diagnósticos, es necesaria la incorporación de controles positivos en los análisis de hibridación molecular. Sin embargo, la disponibilidad de controles obtenidos de fuentes vegetales inoculadas con viroides que no han sido previamente detectados en la zona de estudio y la obtención de viroides de distribución exclusivamente regional o nuevos viroides, son limitantes frecuentes para la optimización de los análisis. Por otro lado, la permanencia de plantas infectadas con viroides que se encuentran en un nivel de plaga cuarentenaria o no reportados, podrían ser un riesgo en cuanto a la fuga de este material hacia plantaciones comerciales. Una alternativa frente a la necesidad de disponer de controles positivos de material infectado, es la elaboración de controles positivos sintéticos, es decir, transcritos monoméricos de polaridad positiva no infectivos, reconstruidos a partir de plásmidos recombinantes que mantienen inserto el genoma total del patógeno (Aparicio *et al.*, 2009; Loconsole *et al.*, 2009). Estos controles positivos reconstruidos podrían adoptar ciertas similitudes al ARN viroide infectivo alojado en una planta inoculada, en cuanto a movilidad electroforética y posibles interacciones moleculares con factores del hospedero. Para asemejar estas condiciones, los transcritos sintetizados son combinados con ARN extraído de una planta sana. Esta composición se define como *spike controls* o *spike samples* (Badiee *et al.*, 2003).

La Citricultura en el Uruguay.

La cadena citrícola de Uruguay mantiene como eslabón inicial la producción de material replicativo para la generación de plantines injertados en viveros mediante propagación vegetativa de plantas madres seleccionadas. Este componente es fundamental en la posterior fase agraria de plantación, manejo, cosecha de la fruta, procesos industriales y exportación. La producción citrícola nacional entre los años 2004-2008 mantuvo un promedio de 288 mil toneladas entre naranjas, mandarinas, limones y pomelos. La superficie del territorio nacional que ocupa el rubro citrícola es de 20 mil ha, con una superficie efectiva de 16,2 mil ha y 7.2×10^6 plantas, de las cuales, un 81,5% están en producción, según las estimaciones de la Encuesta Citrícola Primavera 2009 (MGAP-DIEA). En Uruguay, según términos de superficie, escala de producción y especificidad de las variedades cultivadas, se diferencian dos zonas productoras de cítricos: la zona Norte que está compuesta principalmente por los departamentos de Río Negro, Paysandú y Salto, siendo esta zona la más extensa

(cobertura del 84% de la superficie citrícola). Por otro lado, la zona Sur, posee el resto de la superficie cultivada y se compone fundamentalmente por los departamentos de Soriano, San José, Canelones, Montevideo y Colonia (Bruno, 2003). En cuanto a la exportación de fruta cítrica en la actualidad, la misma representa el 48% del total de la producción. Se observa que los productos cítricos de mayor demanda o valoración internacional son naranjas, mandarinas-clementinas, limones y jugos concentrados, con un porcentaje de volumen físico de 55%, 32%, 11% y 1% respectivamente. Los principales destinos de exportación para los productos cítricos de Uruguay son Holanda, Reino Unido, España, Italia y Rusia (Bruno, 2009). Cabe destacar las actuales negociaciones para lograr el acceso de productos cítricos Uruguayos al mercado Estadounidense. A principios de 2009, el Gabinete Productivo incorporó a la Cadena Citrícola como rubro de gran valor e interés socio-económico nacional, manteniendo y potenciando el respaldo gubernamental para su desarrollo. Por otro lado, con la aprobación de las autoridades del MGAP se decidió avanzar en la elaboración de un Plan Estratégico para el Sector Citrícola que incluye una propuesta de nuevo diseño institucional.

Antecedentes generales de viroides cítricos en Uruguay y distribución en la región.

Las plantaciones citrícolas comerciales en Uruguay, hasta la década de los 40, se encontraban injertadas sobre un patrón de naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.), variedad cítrica tolerante a viroides. Sin embargo, la aparición de razas severas del virus de la tristeza de los cítricos (CTV) generó una pandemia a nivel mundial afectando variedades cítricas injertadas sobre este portainjerto (catalogado como susceptible a este virus), provocando la muerte de millones de plantas y obligando a la sustitución de naranjo amargo por variedades alternativas que se comportaran de manera tolerante a CTV (Bar-Joseph *et al.*, 1989). De esta manera, aproximadamente el 90% de las plantas cítricas nacionales, se establecieron con el patrón *Poncirus trifoliata* L. Raf y sus híbridos (Citrange), los cuales son variedades tolerantes a CTV pero altamente susceptibles a las infecciones por viroides. La propagación de material infectado con viroides que logró escapar al Programa de Saneamiento de la época, la replicación clonal no autorizada que practican algunos productores y la contaminación entre plantas por herramientas de poda en montes en producción determinó una importante diseminación de los viroides en al área citrícola de Uruguay.

En Uruguay, han sido reportadas cuatro especies de viroides cítricos (*CEVd*, *CBLVd*, *HSVd* y *CDVd*) co-infectando diferentes variedades de *Citrus sp.* Los aislados se obtuvieron mediante un relevamiento de plantaciones nacionales de las zonas de Paysandú, Salto, Canelones y San José. Este material fue indexado en cidro Etrog y analizado mediante sPAGE e hibridaciones Dot / Slot blot y Northern blot confirmando la presencia de estos viroides. Sin embargo, en ninguna de las muestras analizadas se diagnosticó el viroide del agrietamiento de la corteza de los cítricos (*CBCVd*) (Pagliano *et al.*, 1998; Pagliano *et al.*, 2000a). Por otro lado, el diagnóstico de *CVd-VI* (ex *CVd-OS*) y *CVd-V* no ha sido hasta el momento ejecutado, ya que estas especies de viroides fueron reportadas recientemente a nivel internacional y no se disponía de la información necesaria para ejecutar los análisis. En la región, principalmente en los países que limitan con Uruguay, el reporte de viroides cítricos mantiene la misma tendencia que los informes de distribución presentados por Pagliano *et al.* (2000a). En el estado de Sao Pablo, Brasil, se detectó con técnicas moleculares la presencia de los viroides *CEVd*, *HSVd* y *CDVd* en bloques de plantas madres de categoría fundación. Sin embargo, no se evidenció la presencia de *CBLVd* ni *CBCVd*, mientras que el *CVd-VI* no fue analizado. Por otro lado, resultados similares fueron reportados en Concordia, Argentina, en donde se reportaron los viroides *CEVd*, *HSVd* y *CDVd* en diferentes variedades cítricas de la región mediante herramientas moleculares, sin ser analizado el *CVd-VI* ni detectados los viroides *CBLVd* y *CBCVd*, para estos últimos, su presencia no puede ser descartada en Argentina ya que las muestras de material vegetal ensayado comprenden un número muy reducido de plantas, las cuales no corresponden representativamente a una muestra de material a campo (Plata *et al.*, 2002). Reportes recientes de Brasil indican que el análisis de la presencia del viroide *CVd-V* en 15 muestras de diferentes variedades cítricas provenientes de plantaciones comerciales no detectó la presencia de este viroide (Serra *et al.*, 2008b).

Programa de Cuarentena, Saneamiento y Certificación de germoplasma cítrico

Aspectos generales y estado actual en Uruguay.

Los problemas sanitarios causados por virus, viroides y bacterias, junto con las exigencias fitosanitarias de los mercados compradores, han obligado a las autoridades responsables, en países de importancia citrícola, a desarrollar Programas de

Saneamiento, Cuarentena y Certificación para la producción de plantas libres de estos patógenos. Los Programas de Certificación de cítricos están diseñados para avalar la incorporación de plantas sanas de alto potencial genético en cultivares productivos, siendo este un paso primordial para un Programa de Manejo Integrado de Plagas (*Integrated Pest Management-IPM-*), basado en algunas instancias, en el control de patógenos conocidos transmitidos por injerto (*GTPs* por sus siglas en inglés). Los componentes fundamentales de un Programa de Certificación de cítricos, según Lee (2009) son: i) *Programa de Cuarentena*, mecanismo encargado de desarrollar los análisis correspondientes para la introducción segura de material vegetal proveniente de áreas exóticas (en especial de áreas de alto riesgo). El germoplasma exótico es necesario para los Programas de Mejoramiento de cítricos, ya que incorporan nuevos caracteres de importancia agronómica en variedades nacionales. La importación de nuevas yemas y varetas de especies híbridas para instalación en plantaciones nacionales, obliga un tránsito continuo de material vegetal foráneo. ii) *Programa de Saneamiento*, se basa en las pruebas y tratamientos que conducen a la producción de material libre de patógenos en base a germoplasma nacional. La selección de variedades particulares con buenos rendimientos y comportamientos favorables a condiciones climáticas locales, son la fuente original de material vegetal para saneamiento y su posterior aprovechamiento. Los árboles seleccionados de fuentes locales son saneados mediante técnicas de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* o embrionía nucelar. Posteriormente, el estado sanitario del material vegetal es testado con plantas indicadoras y herramientas moleculares diagnósticas de alta sensibilidad y confiabilidad. Finalmente, las plantas saneadas y chequeadas por este programa y reubicadas como material de origen en los bloques fundación, necesitan de pruebas diagnósticas recurrentes para comprobar si permanecen libres de patógenos transmisibles por injerto. iii) *Programa de Certificación*, tiene como objetivo garantizar el estatus genético y sanitario del material propagativo que es liberado a través de los viveros. El Programa de Certificación se encarga de la distribución del material vegetal libre de patógenos que fue originado desde los programas de Cuarentena y de Saneamiento. A su vez, ejecuta ensayos diagnósticos para certificar que patógenos transmisibles por injerto no acompañan las variedades y cultivares liberados. Estos ensayos diagnósticos se limitan a los materiales de propagación de los bloques fundación primarios protegidos (PPFB), debido a que, según las herramientas diagnósticas disponibles, los tiempos de obtención de resultados y los costos, es improbable realizar un tamizaje en busca de viroides en componentes

secundarios de los Programas de Certificación (bloques de multiplicación y bloques de plantas de vivero certificadas).

En Uruguay, la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) es el programa del M.G.A.P reconocido como organización nacional de protección fitosanitaria. En esta organización, los Laboratorios Biológicos de la División de Análisis y Diagnóstico son los encargados de realizar los ensayos para la intercepción de virus y viroides (cuarentenarios regulados y cuarentenarios no regulados) en material propagativo de importación. A su vez, vigilan el estado fitosanitario de los bloques que componen el Programa de Certificación. En nuestro país el Programa de Certificación cítrica no está operativo, sin embargo, los aspectos de vigilancia de plagas cuarentenarias están vigentes a nivel de introducción de germoplasma con fines de regeneración de variedades cítricas. Los viroides cítricos, no aparecen en las listas de plagas reguladas por la DGSSAA, por lo que no hay una norma establecida para estos agentes infecciosos en las regulaciones vigentes. Sin embargo, se ha relevado información sobre la presencia de viroides en clones primarios (progenies derivadas de las variedades microinjertadas que conforman el Bloque Fundación Primario) mediante indexaje biológico con planta bioamplificadora, tomando en cuenta un nivel de tolerancia de 0% (Ing. Agr. Jacques Borde, Departamento de Mejora Fitosanitaria, DGSSAA, *com.pers*). Cabe destacar los esfuerzos conjuntos entre la Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola (CHNPC), la DGSSAA-MGAP, INASE, Facultad de Agronomía-UdelaR e INIA para la implementación de un Plan de Saneamiento de Material de Propagación Vegetal y una renovación-ampliación del Bloque Fundación Primario Protegido. Este objetivo fue planteado para 2010-2012, el cual dá origen a la recomposición del Programa de Certificación Citrícola en Uruguay.

En países como España (Valencia), Francia (Córcega), Italia (Campania) EUA (Texas, Florida y Arizona), México, Israel, China, Japón y Australia, se mantiene a los cultivos cítricos como rubro de interés socio-económico. Estos países poseen normativas que han incluido a los viroides como patógenos regulados, por ejemplo, la NRMF N°16 de países miembros de la NAPPO-México/EUA-(NAPPO, 2008), el Programa de Mejoramiento de Variedades Cítricas, España (CVIPS)(Navarro *et al.*, 2002), el Programa de Certificación y Registro de Citricos, Israel (CRCP), el Programa de Protección Clonal de Citrus, California (CCPP) (Vapnek, 2009), el Programa de Certificación y Sistema de Viveros libres de virus-viroides (VFNS), China (Su, 2008) y

el Programa de Certificación de plantas cítricas del MAFF-NIFTS, Japón, entre otros. Estos países realizan chequeos sistemáticos de los PPFB y aplican medidas preventivas de control basadas en la utilización de material de propagación libre de estos agentes infecciosos. En Uruguay, es necesaria la reactivación y buen funcionamiento del Programa de Saneamiento y Certificación, Sistemas de Cuarentena rigurosos con métodos de detección que presenten elevada sensibilidad-confiabilidad y el monitoreo fitosanitario permanente de las plantas en vivero con técnicas biotecnológicas novedosas de diagnóstico que puedan ser implementadas, optimizadas e incorporadas en los ensayos rutinarios para la detección de viroides.

Objetivo General.

Implementar un método de diagnóstico molecular para los viroides cítricos *CBCVd* y *CVd-VI* en variedades cítricas en producción a campo, basado en hibridaciones moleculares Northern blot con sondas ADNc marcadas con digoxigenina, factible a ser incorporado en acciones de mejora Fitosanitaria, Certificación y Cuarentena de Citrus en Uruguay.

Objetivos Específicos

- Obtener un método eficiente para la extracción de ARN viroide a partir de tejido específico de variedades cítricas a campo.
- Ajustar la técnica PCR y RT-PCR para la recuperación y amplificación del genoma viroide completo, a partir de plásmidos recombinantes y ARN de planta indicadora.
- Obtener sondas marcadas no-radioactivas (digoxigenina) por PCR para el diagnóstico de *CBCVd* y *CVd-VI* mediante hibridación molecular.
- Implementar la metodología de diagnóstico molecular sensible, específica y confiable basada en hibridaciones Northern blot dirigida a los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* descrita por Murcia *et al.*, 2009.
- Evaluar para las condiciones locales de análisis, la respuesta de la herramienta molecular Northern blot en cuanto al nivel de sensibilidad, especificidad y confiabilidad de la técnica.
- Releva plantas a campo de diferentes variedades y zonas citrícolas de Uruguay, con la finalidad de diagnosticar, mediante la técnica implementada, la presencia/ausencia de *CBCVd* y *CVd-VI* en el territorio nacional.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Plantas indicadoras cidro Etrog.

El material vegetal huésped conteniendo aislados de diferentes especies de viroides, se obtuvo mediante la generación de plantas indicadoras del clon cidro Arizona Etrog 861-S1 (*C. medica* (L) var. Etrog Engl.) injertado sobre limón rugoso (*C. jambhiri* Lush.). Estas plantas se inocularon por injerto de escudete con yemas o cortezas de plantas (infectadas) colectadas a campo y se mantuvieron bajo condiciones controladas, con una temperatura entre 28°C-32°C y fotoperiodos de 16 horas de luz. Por otro lado, se utilizaron cidros del banco de germoplasma del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, los cuales contenían aislados de distintas especies de viroides (**Tabla 1**). Se obtuvieron aislamientos de viroides provenientes de la Dirección General de Servicios Agrícolas (DGSSAA) cedidos por el Ing.Agr. J. Borde, así como del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Salto Grande facilitados por la Ing.Agr. A. Bertalmío. Controles positivos provenientes del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), España fueron cedidos por la Dra. Nuria Durán-Vila.

Tabla 1. Colección de material de referencia de plantas indicadoras cidro Etrog y plantas colectadas a campo, indicando las especies viroides que las infectan y la técnica diagnóstica empleada.

Código de la muestra	Infección viroide	Referencia
Cidro sano	Sin infección ¹⁻²⁻⁵	Com.pers J. Borde y este estudio
Cidro CEVd-17	CEVd ¹⁻²⁻⁵	Com.pers J. Borde y este estudio
Cidro CBLVdES	CBLVd ²⁻⁴	Este estudio
Cidro 006	HSVd ¹⁻²⁻³⁻⁴	Pagliano <i>et al</i> , 2002b y este estudio
Cidro 161	HSVd ¹⁻² , CDVd ¹⁻²⁻⁵	Este estudio
Cidro 152B	HSVd ¹⁻²⁻³⁻⁴	Pagliano <i>et al</i> , 2002b y este estudio
Cidro LE.1FAg	CBCVd ¹⁻²	Este estudio
Cidro 804	CBCVd ¹⁻²⁻³⁻⁵	Com.pers J. Borde y este estudio
Cidro S370	CEVd ¹⁻³⁻⁴⁻⁵ , CDVd ¹⁻³⁻⁴⁻⁵	Pagliano <i>et al</i> , 2002b y este estudio
Cidro AM1	CEVd ¹⁻³⁻⁴⁻⁵ , HSVd ¹⁻³⁻⁴ , CDVd ¹⁻³⁻⁴⁻⁵	Pagliano <i>et al</i> , 2002b y este estudio
1124-5IVIA	CEVd ²⁻⁴ , CBLVd ²⁻⁴ , HSVd ²⁻⁴ , CDVd ²⁻⁴	Com.pers Nuria Duran-Vila y este estudio
Limón K395	CEVd ¹⁻²⁻³ , HSVd ² , CDVd ²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Limón PE390	CEVd ² , CBLVd ² , HSVd ² , CDVd ²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Limón FB380	HSVd ²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Naranja PEWN02	CEVd ² , CBLVd ² , HSVd ² , CDVd ²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Naranja PEWN04	CBLVd ² , HSVd ²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Naranja PEWN01	Sin infección ¹⁻²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Pomelo CDL070	Sin infección ¹⁻²	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio
Limón CDL384	Sin infección ¹⁻²⁻³	Umaña <i>et al</i> , 2010 y este estudio

¹ RT-PCR con cebadores específicos

² Northern Blot con sondas específicas

³ Dot Blot/Slot Blot con sondas específicas

⁴ sPAGE

⁵ Diagnóstico biológico mediante sintomatología en cidro Etrog

Variedades cítricas de plantaciones comerciales

Se colectaron 84 muestras entre las variedades Pomelo Star ruby, Duncan y Marsh seedless, Naranja dulce Washington Navel y Valencia late, Mandarina común, Murcott, Satsuma y Ellendale; Limón Lisbon, Kumquat, Naranja trifoliada y *C. volkameriana* localizadas en plantaciones comerciales, estaciones experimentales y de fincas particulares distribuidas en los departamentos de Canelones, Montevideo, San José, Colonia, Río Negro y Salto (Ver **Tabla.3** y **Figura.14**). Los árboles relevados abarcan entre plantas jóvenes hasta plantas de 40 años de edad (en su mayoría), todos injertados sobre *Poncirus trifoliata*, el cual presentaba o no sintomatología típica de enanismo y/o descascarado del portainjerto.

Plásmidos recombinantes

El plásmido vector utilizado fue el pCR2.1 (Invitrogen™) conteniendo como inserto la secuencia del genoma total del viroide *CBCVd* (TS47) o del viroide *CVd-VI* (S10S EILabb), los cuales fueron cedidos por el Dr. Takao Ito del Kichinotsu Citrus Research Station, National Institute of Fruit Tree Sciences (NIFTS), Japón. Por otro lado, los plásmidos vector pGEM®-T-Easy (Promega) recombinantes conteniendo: el genoma completo del viroide *CEVd* (clon 054.11), *CDVd* (pCDVd III), *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, además de los productos RT-PCR, estaban disponibles en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía, UdelaR (Pagliano *et al.*, 1998 y 2000b).

Transformación de células *E. coli* quimio o electrocompetentes con plásmidos recombinantes pCR2.1TS4.7 / pCR2.1S10S EILabb

Obtención de células competentes.

La obtención de células *E. coli* quimiocompetentes de la cepa DH5 α se realizó mediante el método de cloruro de rubidio según lo describe Pagliano (2000b). Las células electrocompetentes se indujeron incubando a 37°C (en agitación) 5mL de cultivo fresco de la cepa DH5 α en 500mL de medio Luria-Bertani (LB) hasta una D.O₅₅₀ de 0.5-0.8. Se incubó en hielo para detener el crecimiento y se concentraron las células mediante centrifugación a 4000 xg, 10min a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 500mL de agua MQ estéril a 8°C, se repite por triplicado los pasos de centrifugación y resuspensión hasta obtener un volumen final de 50mL, seguido de un

último paso de centrifugación a 4000 xg, 10min a 4°C y resuspensión en 5mL de glicerol estéril a 4°C y al 10% (v/v). Las células se alicuotaron en tubos eppendorf estériles de 1.5mL con 50 µL cada uno y se conservaron a -80°C.

Transformación de células competentes con plásmidos recombinantes.

La transformación de los plásmidos recombinantes en células quimiocompetentes se desarrolló según el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). En el caso de transformación de células electrocompetentes, un volumen de 50mL de células fueron transformadas mediante la adición de 75ng de ADN plasmídico, conteniendo el inserto del genoma total de *CBCVd* o *CVd-VI*. La mezcla se transfirió a una cubeta de vidrio (2mm) del electroporador (Eppendorf North America) y se aplicó un pulso de 2000V durante 4 milisegundos en módulo procariota. Inmediatamente se agregó 1mL de medio LB y se incubó 1.5 horas a 37°C en tubos de vidrio, luego se colectaron las células por centrifugación a 4000 xg, 1min y se resuspendió en 100µL de LB. La selección de colonias transformadas se realizó por el método convencional de α -complementación. La suspensión de células transformadas se plaqueó sobre medio de cultivo LB-Agar previamente preparado con 100µL de ampicilina (10mg/mL), 20µL de X-Gal (50ug/mL) y 100µL de IPTG (20mg/µL) para la selección de recombinantes. La purificación de ADN plasmídico (minipreps) se realizó mediante el kit High Pure Plasmid Isolation (Roche Molecular Biochemicals) y los procedimientos fueron llevados a cabo según el manual de uso. Se verificó que los clones obtenidos mantuvieran la secuencia completa del genoma de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* mediante amplificación por PCR con cebadores específicos.

Colecta de material vegetal de cidros inoculados y plantas de campo de diferentes variedades cítricas

Para el caso de plantas de cidro infectado expresando síntomas típicos de etiología viroide se colectaron hojas y/o corteza de ramas. En el caso de plantas cítricas de campo, se muestrearon varas de 50 cm de largo de ramas con 0,1-1cm de diámetro de variedades cítricas. Hasta su posterior procesamiento (obtención de la corteza de las ramas) el material vegetal se almacenó a 4°C. Todos los tejidos vegetales fueron pulverizados con N₂ líquido mediante un *mixer* doméstico (Ufesa^{MR}) modificado y la cantidad de material reducido a polvo utilizado en cada tipo de extracción se estandarizó a 5 gramos, ajustándose los volúmenes de reactivos según el caso.

Métodos de Extracción de ARN

i) Método de extracción viroide convencional (EVC)

Este método fue diseñado para la obtención de un elevado título de viroide de material vegetal específico (Semancik *et al.*, 1975). El tejido pulverizado (5 gramos) se homogenizó en medio de extracción (0.4M Tris-HCl, pH 8.9; 1% (w/v) SDS; 5 mM EDTA, pH 7.0; 2% (v/v) mercaptoetanol) junto con fenol saturado en agua a pH neutro, en una relación 1:1:3. La homogenización fue facilitada con intervalos de agitación en vortex (15s de agitación / 1min de reposo, por triplicado). Se centrifugó a 8.000 xg durante 20 minutos (4°C) y se recolectó la fase acuosa estimando su volumen. Se agregó a esta fase, un décimo del volumen de acetato de sodio 3M, pH 5,5 y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó 1 hora a -20°C (la precipitación de ácidos nucleicos totales es evidente por floculación de la solución) y se centrifugó a 8.000 xg durante 20 minutos (4°C). Se secó el precipitado a temperatura ambiente y se resuspendió en 1.5mL de medio de resuspensión TKM 1X (10mM Tris-HCl, pH 7.4; 10mM KCl; 0.1mM MgCl₂). El resuspendido se colocó en tubos de diálisis (Sigma® Aldrich 33mm, membrana de celulosa con retención de moléculas de más de 12.400 P.M). Se dializó en medio TKM 1X durante toda la noche a 4°C en agitación. La preparación dializada fue sometida a una partición en 2M LiCl y se incubó 4 horas a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 8.000 xg durante 10 minutos para separar la fracción soluble en Litio (los viroides de la familia *Pospiviroidae* son solubles en LiCl 2M). Al sobrenadante recuperado se le agregaron 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se incubó 1 hora a -20°C para precipitar y concentrar los ácidos nucleicos. Por último, se centrifugó la solución (8.000 xg, 20min) y el precipitado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 300µL de TKM 1X.

ii) Método Fenol / Tiocianato de guanidina (FTG)

El protocolo empleado se basó en los pasos descritos por Chomczynski y Sacchi (1987). El tejido pulverizado (5 gramos) se homogeneizó en el reactivo TriPure® (Roche™) facilitado con intervalos de agitación en vortex (15s de agitación / 1min de reposo, por triplicado). Se clarificó el homogeneizado por centrifugación a 12000 xg, 4°C durante 10min, se recuperó el sobrenadante y se separaron las fases con cloroformo. El ARN fue aislado de la fase acuosa mediante precipitación con isopropanol, lavado con etanol 75% y resuspendido en 300 µL de H₂O MQ.

iii) Método SDS/Acetato de Potasio (SAP)

El método descrito por Cañizares *et al.* (1998) fue desarrollado con algunas modificaciones. Se homogenizaron 5 gramos de tejido pulverizado en tampón de extracción (0.1 M Tris-HCl, pH 8.9; 50 mM EDTA; 0.5 M NaCl; 25 mM mercaptoetanol) facilitado con intervalos de agitación en vortex. La solución resultante fue tratada con SDS 20% (pH 7.2) e incubada a 65°C durante 20min. Posteriormente se adicionó acetato de potasio 5M (pH 7.5) y se incubó 30min en hielo. La separación de fases se realizó mediante centrifugación (15 min a 12000 xg, 4°C); se colectó el sobrenadante y se agregaron volúmenes iguales de una solución PEG 20%-NaCl 1M manteniendo en reposo durante 1 hora a 4°C, seguido de una centrifugación (15 min a 12000 xg, 4°C) con el fin de precipitar los ARNs de alto peso molecular y recuperar en el sobrenadante los ARNs pequeños. Por último se realizó una precipitación y limpieza de los ácidos nucleicos durante 1 hora a -20°C con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, centrifugación por 5 min a 7500 xg, secado del precipitado a temperatura ambiente y resuspensión en 300 µL de H₂O MQ.

iv) Método Formaldehído/SSC (FS)

Se desarrolló por el Centro Internacional de la papa para el diagnóstico molecular del viroide ahusado de la papa (*PSTVd*) (International Potato Center, 1997) y aplicado en este estudio para el diagnóstico de viroides en cítricos. Se agregó 2mL de tampón de extracción (5X SSC / 18.5% formaldehído) por cada gramo de tejido pulverizado (5 gramos). Se homogenizó la solución, mediante agitación en vortex, con 0.5 volúmenes de fenol saturado en agua (pH 7.0) y 0.5 volúmenes de cloroformo. La separación de fases se obtuvo por centrifugación a 5000 xg durante 5min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol manteniendo la solución 1 hora a -20°C. Posteriormente se centrifugó (30min a 3000 xg, 4°C.), se lavó el pellet con etanol 75% y se resuspendió en 300 µL de H₂O MQ.

Cuantificación de Ácidos Nucleicos.

ADN plasmídico, sondas marcadas, transcriptos monoméricos (ARNc) y ARN total.

La concentración de ADNp, sondas-DIG, ARNc, ARN total de hojas de cidro y ARN de tejido del floema de plantas a campo fue medida por espectrofotometría UV

visible. La aplicación directa de un micro-volumen diluido de muestra en el lector del equipo NanoDrop “Thermo Scientific 1000”, fue suficiente para obtener la concentración de ADN y ARN en ng/ μ L. El módulo de ácidos nucleicos del software proporcionó los coeficientes 260/280nm y 260/230nm. Se consideró que el valor óptimo (indicador de pureza), para ARN es 1.9 y ADN 1.8 (Manchester, 1995).

Transcripción reversa (RT) y amplificación por reacción de polimerización en cadena (PCR).

Con las extracciones de ARN obtenidas mediante los métodos propuestos, se desarrollaron ensayos de transcripción reversa del genoma viroide (secuencia completa). Todas las reacciones fueron ejecutadas en un termociclador con gradiente Corbett Research, modelo Palm-Cycler.

RT-PCR del viroide CEVd: Síntesis de la primera cadena.

La síntesis de la primera cadena ADNc del viroide *CEVd* se realizó por transcripción reversa utilizando el cebador complementario CEVd-R1 (5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3') (Bernad y Duran-Vila, 2006). Este cebador está dirigido a la hebra superior de la región CCR viroide. Las muestras conteniendo el ARN molde (~200ng) fueron desnaturalizadas en un primer paso a 85°C durante 5min, posteriormente se aplicó una temperatura de 55°C por 1min junto con 1.25 μ M de cebador complementario (volumen final 8 μ L), seguido de una incubación en hielo durante 3min. El segundo paso de reacción sintetizó la primera cadena de ADNc viroide mediante 50U de la enzima RevertAid™ transcriptasa reversa M-MuLV RNasa H⁻ (Fermentas) en una mezcla de reacción conteniendo tampón de reacción 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 4 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT (Fermentas), dNTPs (0.4mM de cada uno) en un volumen final de 13 μ L, con una incubación a temperatura óptima de 42°C durante 1 hora y seguido de un periodo de inactivación enzimática de 3min a 90°C.

RT-PCR del viroide CEVd: Síntesis de la segunda cadena

La síntesis de la segunda cadena de ADNc viroide y posterior amplificación, se realizó mediante PCR en una mezcla (volumen final 25 μ L) conteniendo 4 μ L de reacción de la primera cadena, 0.5U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen®), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 0.2mM de dNTPs y 0.5 μ M de cada

uno de los cebadores: CEVd-R1 complementario (5'-CCGGGGATCCCTGAAGGA-3') y CEVd-F1 homólogo (5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3') (Bernad y Duran-Vila, 2006). Los parámetros para la PCR consistieron en un paso de desnaturalización a 94°C por 5min, seguido por 36 ciclos de 94 °C por 30s, 55°C por 30s, 72°C por 1min y finalmente un paso de extensión de 72°C por 5min (Pagliano,2000b).

Ajuste de la amplificación por PCR de los insertos ADNc de CBCVd y CVd-VI

Se ajustaron los parámetros y condiciones de la PCR para los ADNc de *CBCVd* y *CVd-VI* mediante amplificación con gradiente de temperatura (58°C a 65°C) utilizando como ADN molde los plásmidos recombinantes pCR2.1TS4.7 (genoma completo de *CBCVd*) y pCR2.1S10S EILabb (genoma completo de *CVd-VI*). Los cebadores complementario y homólogo utilizados en la reacción PCR-*CBCVd* fueron CVIV-CM (-) 5'-GGATCCCTCTTCAGGTATGT-3' y CVIV-CP (+) 5'-CCGGGGAAATCTCTTCAGACTC-3' respectivamente (Puchta, 1991). Los cebadores utilizados para la reacción PCR-*CVd-VI* fueron CB3-CM (-) 5'-ACGACAGGTGAGTTCTCCTT-3' y CB3-CP (+) 5'-CGTCGACGAAGGCATGTGAGCT-3', complementario y homólogo respectivamente (Ito *et al.*, 2001). Las condiciones finales para la polimerización en cadena del ADNc viroide insertado en los vectores molde para una reacción con volumen final de 25µL consistió en una mezcla de reacción con 1.3ng de ADN plasmídico, 0.5U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen®), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 0.2mM de dNTPs y 0.5uM de cada uno de los cebadores según corresponda. Los parámetros para la PCR consistieron en un paso de desnaturalización (94°C por 5min), 36 ciclos con gradiente de temperatura (92°C, 20s, 58°C a 65°C, 20s, 72°C ,40s) y finalmente un paso de extensión de 72°C por 5min. Con el fin de obtener resultados discriminantes a nivel de especificidad, en este ensayo se incluyeron otros plásmidos recombinantes y productos de amplificación de otros viroides que presentan elevada similitud de secuencia con *CBCVd* tal como *CEVd* y con *CVd-VI* la especie *CDVd*. Los controles discriminantes utilizados para *CBCVd* y *CVd-VI* fueron pCEVd 054.11 y pCDVd III respectivamente.

Generación de ADNc doble hebra de secuencia completa de genomas de los viroides CBCVd y CVd-VI mediante RT-PCR

Para la transcripción reversa de *CBCVd* y *CVd-VI* se utilizaron los cebadores complementarios específicos CVIV-CM (-) y CB3-CM (-) respectivamente. La reacción de síntesis de la primera cadena se hizo en 2 pasos: desnaturalización del ARN molde (~200ng) a 90°C, 5min y 64°C por 1min junto con 1.25uM de cebador complementario (volumen final 8µL), seguido por incubación en hielo durante 3min. El paso de síntesis de ADNc viroide se realizó en una mezcla de reacción conteniendo 8µL de la mezcla de desnaturalización, 50U de la enzima RevertAid™ transcriptasa reversa M-MuLV RNasa H⁻ (Fermentas), tampón de reacción 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 4 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM DTT (Fermentas), dNTPs (0.4mM de cada uno) en un volumen final de 13µL, con una incubación a 45°C por 1 hora y 3min a 90°C para terminar la reacción. La síntesis de la segunda cadena mediante PCR se diseñó con una mezcla de reacción que contiene 2µL de ADNc, 0.5U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen®), 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 0.2mM de dNTPs y 0.5uM de cada uno de los cebadores complementario y homólogo detallados en la sección anterior, según corresponda al viroide a detectar. El ciclo térmico utilizado en la reacción de amplificación fue de 94°C por 5min para desnaturalizar la muestra, seguido de 36 ciclos (92°C, 20s, 64°C, 20s, 72°C ,40s) y finalmente un paso de extensión de 72°C por 5min. Para todos los productos de amplificación, se realizaron análisis de movilidad electroforética en geles de agarosa al 2%. Marcadores de peso molecular 50pb (Fermentas) se utilizaron para verificar que la síntesis y amplificación de ADN de las reacciones PCR y RT-PCR revelen los productos del tamaño esperado.

Análisis de secuencia del genoma viroidal

Los plásmidos recombinantes pCR2.1TS47 y pCR2.1S10S EILabb, además de los clones obtenidos en este trabajo mediante transformación de células competentes con estos vectores (S10S clon 1, TS47 clon 4), fueron secuenciados en dos direcciones (cebadores M13 Fw-Rev) con un secuenciador automático 3730xl DNA Analyzers (Applied Biosystems) para confirmar la identidad de los insertos del genoma completo de las especies *CBCVd* y *CVd-VI* respectivamente. Los amplicones obtenidos por RT-PCR utilizando los pares de cebadores CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+) y CB3-CM (-) / CB3-CP (+) fueron purificados mediante los *kits* Wizard® PCR Preps DNA Purification Systems (Promega) y S.N.A.P™ UV-Free Gel Purification (Invitrogen®), según las

instrucciones del fabricante y secuenciados en dos direcciones. Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa FinchTV1.4 DNA Sequence analysis (Geospiza™) y ensambladas automáticamente con el programa Sequencher® 4.9 DNA Sequence Assembly (Gene Codes Corporation). Posteriormente fueron sometidas a un análisis de alineamiento múltiple con la herramienta ClustalW (BioEdit v7.0.0, Isis Pharmaceuticals Inc) y análisis comparativo de bases e identidad de secuencias con el programa BLASTN 2.2.22 utilizando el algoritmo *blastn* del servidor NCBI (Altschul *et al.*, 1990).

Transcripción in vitro del genoma total de *CBCVd* y *CVd-VI* contenido en vectores plasmídicos.

El ADNc clonado en los plásmidos TS4.7 y S10S ElLabb fue utilizado para sintetizar transcritos monoméricos de polaridad positiva (controles positivos regenerados), a partir del promotor *T7* ARN polimerasa del vector pCR2.1 (Invitrogen®) que mantiene insertos los genomas viroides de las especies *CBCVd* y *CVd-VI*. El plásmido recombinante se purificó mediante el *kit* High Pure Plasmid Isolation (Roche Molecular Biochemicals) según las instrucciones del fabricante. Se linearizó 1 µg de ADNp con 10U de enzima *Hind* III (Fermentas) en tampón R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA) a 37°C por 1 hora. La purificación del plásmido linearizado se realizó con el *kit* Wizard® PCR Preps DNA Purification Systems (Promega) y la transcripción del fragmento de ADNc viroide se ejecutó mediante la enzima *T7* ARN polimerasa (Promega) siguiendo las intrucciones del fabricante. Finalmente un tratamiento con ADNasa fue desarrollado. Los transcritos sintetizados y purificados mediante precipitaciones con etanol y acetato de amonio (remoción de los rNTPs sin reaccionar) fueron movilizados en geles de agarosa al 2% para confirmar su presencia. Para las hibridaciones Northern blot, los transcritos monoméricos sintetizados para *CBCVd* y *CVd-VI* fueron utilizados como controles positivos, de manera que se elaboró una mezcla de ARNc con ARN de una planta sin infección, simulando un control positivo natural (*spike control / sample*) (Badiee *et al.*, 2003).

Elaboración de sondas marcadas por PCR

El ADNc viroide de las especies *CBCVd* y *CVd-VI* fue marcado mediante la incorporación de digoxigenina (DIG-11-dUTP) (Roche Molecular Biochemicals)

mediante PCR (Palacio *et al.*, 1999). La mezcla de reacción se diseñó de la siguiente manera: se dispuso de 325pg de plásmido recombinante como ADN molde, en una solución con 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.6 mM MgCl₂, 0.2mM de mix de dNTPs (GTP, CTP, ATP), 0.14mM de TTP, 0.5uM de cada uno de los cebadores complementario y homólogo, 0.5U de *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen®) y 1nmol de digoxigenina-11-2'-deoxy-uridina-5'- trifosfato, alcalino-estable. El programa de reacción consistió en 94°C por 5min, 40 ciclos 92°C, 20s, 64°C, 20s, 72°C ,40s y finalmente un paso de extensión de 72°C por 5min. El tamaño de los productos de amplificación con ADNc viroide marcado y ADNc sin marcar fueron verificados en geles de agarosa al 1.5% mediante movilidad electroforética relativa al marcador de peso molecular 50pb (Fermentas). Para los ensayos de sensibilidad y eficiencia de las hibridaciones Northern blot con los modelos experimentales Citrus Exocortis Viroid (*CEVd*), Citrus Bent Leaf Viroid (*CBLVd*), Hop Stunt Viroid (*HSVd*) y Citrus Dwarfing Viroid (*CDVd*), las sondas de cada uno de estos viroides se dispusieron del Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, UdelaR. (Pagliano *et al.* 1998 y 2000a).

Hibridación Molecular no isotópica con sondas marcadas DIG-11-dUTP.

Electroforesis de ARN y transferencia a membranas: Northern Blot

Para éste análisis, el ARN extraído (alícuotas de 20µL que corresponden a 333mg en peso fresco de tejido), se separó por movilidad electroforética (estructura vertical con cristales 10cm x 17cm) en geles de poliacrilamida (PAGE) al 5%, TAE 1X, en condiciones no desnaturizantes, durante 3 horas a 60mA. La observación del complejo de ácidos nucleicos se logró mediante tinción con bromuro de etidio y visualización en un transiluminador UV. El segmento del gel que comprende el ARN ribosomal 7S (movilidad electroforética aproximada al complejo viroide en estas condiciones) fue recortado y electrotransferido (400mA, TBE 1X durante 1.5 horas) a membranas de Nylon cargadas positivamente (Roche Applied Science) (Serra *et al.*, 2008b). Para verificar que la totalidad de los ARNs fueron electrotransferidos en las condiciones descritas, se sometió al gel resultante del proceso de transferencia a una tinción con nitrato de plata.

Electroforesis de ADN y transferencia a membranas: Southern blot.

Para este ensayo, los productos de PCR se movilizaron en geles de agarosa al 1%, TAE 1X, se recortó la zona de visualización de las bandas de tamaño esperado y se electrotransfirió en membranas N⁺ como se detalla anteriormente.

Siembra directa de ácidos nucleicos a membranas: Dot blot.

Los ARNs utilizados en este ensayo (6μL equivalentes a 100mg en peso fresco de tejido) fueron pretratados con 6μL de formamida y 1.5μL de 20X SSC e incubados por 15min a 68°C (Sambroock *et al.*, 1989). Las muestras fueron sembradas en la membrana y secadas a temperatura ambiente. Para el ensayo de eficiencia del marcaje no radioactivo de las sondas respecto a un control ADN plasmídico lineal marcado, los productos fueron incubadas a 75°C por 10min sin pretratamiento con reactivos desnaturizantes; sembrados en la membrana para posterior detección y revelado con anti-DIG-fosfatasa alcalina y CSPD (sin prehibridación ni hibridación previa) como se describe más adelante.

Fijación de los ácidos nucleicos, hibridación, detección y visualización de los híbridos.

En todos los ensayos, las membranas con ARN y ADN transferidos, se expusieron a un tratamiento de 70 000 μJoules/cm² en un horno UV crosslinking (Hoefler-Uvc500, Amersham Biosciences Corp.) para fijar los ácidos nucleicos. En el caso del método Northern blot, la prehibridación (42°C durante 2 horas) y la hibridación (60°C toda la noche) de la membrana con los ARNs 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 ubicados en un horno Hybaid Shake 'n' Stack (Thermo Scientific). Antes del proceso de hibridación, las sondas marcadas no radioactivas fueron desnaturizadas durante 5 min a 95°C e inmediatamente colocadas en hielo. Para estimar los microlitros de sonda a utilizar por cada 10mL de solución de hibridación en la incubación con la membrana y utilizando la concentración de uso de la sonda (25ng/cm²) definida por Palacio *et al.*, (1999), se siguió la ecuación: [DIG-sonda] x μL de sonda/cm² de membrana = 25ng/cm². Después de la hibridación, las membranas fueron lavadas (siempre en rotación en el horno de hibridación) dos veces en 2X SSC, 0.1% SDS a temperatura ambiente por 15min y

luego una incubación a 60°C durante 1 hora en una solución de 0.1X SSC, 0.1% SDS. Por último, un lavado con tampón (0.1M de ácido maleico, 0.15M NaCl; pH 7.5; 0.3% (v/v) Tween 20) durante 5 min a temperatura ambiente. La membrana se bloqueó con solución de bloqueo 1X (Roche™) durante 40min a temperatura ambiente. Los híbridos sonda DIG-ARNvd fueron detectados con un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina (Fab fragments) agregando 0.3U/mL de anticuerpo en una solución de bloqueo 1X. El anticuerpo no unido a la digoxigenina fue lavado de la membrana y del tubo de hibridación con una solución de 0.1M de ácido maleico, 0.15M NaCl; pH 7.5; 0.3% (v/v) Tween 20, por duplicado durante 15min a temperatura ambiente, seguido de una estabilización con tampón de detección (0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5) por 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, la visualización de los híbridos ARNvd-DIG-Ac-AP se desarrolló mediante la incorporación de 0.35mM de sustrato quimioluminiscente CSPD (Roche™) e incubación 30min a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron con placas radiográficas en un *cassette* de revelado (20min a 37°C). La luz visible emitida por la defosforilación del CSPD fue retenida por la placa y revelada por autoradiografía. Procedimientos similares de prehibridación, hibridación, lavado y detección fueron ejecutados con ADNc transferido a membranas (Southern blot) o sembrado directamente (Dot-blot). Las señales de hibridación producidas en los ensayos Northern blot, Southern blot y Dot Blot fueron cuantificadas por un análisis densitométrico de la fotografía de la placa revelada utilizando el programa 1DScan EX versión 3.1 DEMO (Scanalytics, Inc.). Se utilizó un método de corrección de ruido de fondo (*background*) estimado por la imagen (corrección automática con el mínimo píxel) o designado por un control dentro de la imagen. Las intensidades de señal fueron reportadas en unidades relativas de intensidad de señal (UR). Los análisis de regresión, las pruebas *t*, las gráficas de dispersión y de columnas fueron diseñados con el programa InfoStat© versión 2008 *student*.

Resultados

Capítulo 1. Evaluación de métodos de extracción de ARN viroide en referencia a herramientas moleculares de diagnóstico disponibles y caracterización de la técnica Northern blot en cuanto a sensibilidad y eficiencia diagnóstica en variedades cítricas colectadas a campo.

Uno de los principales elementos a considerar en el desarrollo de una metodología de diagnóstico de plantas de campo infectadas con viroides mediante técnicas moleculares es contar con un método de extracción de ARN que sea eficiente, basado en la concentración y alta pureza del ARN obtenido. Los posibles contaminantes remanentes en la extracción deben ser tomados en cuenta ya que pueden afectar el posterior resultado diagnóstico según sea la herramienta molecular empleada. Esta última condición se evalúa mediante el análisis del espectro de absorción del ARN obtenido y funcionalmente, mediante la observación de productos amplificados mediante la reacción enzimática RT-PCR y por el nivel de señal obtenido mediante hibridaciones moleculares tales como Northern blot y Dot blot. Además, los tres métodos de diagnóstico mencionados pueden presentar diferentes niveles de respuesta analítica y sensibilidad. En la primera parte de este capítulo se comparan cuatro métodos de extracción de ARN en su efecto sobre la capacidad de detectar presencia/ausencia del viroide *CEVd* en plantas de limón “Lisbon” de referencia mediante los abordajes RT-PCR, Northern blot, y Dot blot. En la segunda parte, una vez ajustada la mejor combinación del método de extracción de ARN/método de detección, se evaluó: i) la sensibilidad (límite de detección) del método Northern blot en la detección de los viroides Citrus exocortis viroid (*CEVd*), Citrus bent leaf viroid (*CBLVd*), Hop stunt viroid (*HSVd*) y Citrus dwarfing viroid (*CDVd*) presentes simultáneamente en una planta de Limón “Lisbon” y ii) la eficiencia (rango de variedades cítricas para el cual el método de diagnóstico es informativo) y el punto límite de presencia/ausencia (*cut-off*) en la detección de *HSVd* y *CDVd* en muestras de tejidos de variedades cítricas colectadas de montes en producción.

Efecto del método de extracción de ARN en el nivel efectividad diagnóstica de tres metodologías de detección viroide: RT-PCR, Northern blot y Dot blot

Cuantificación y pureza de ARN total obtenido por distintos métodos de extracción utilizando espectrofotometría.

Los resultados de cuantificación del ARN total extraído de plantas en condiciones de campo mediante espectrofotometría NanoDrop mostraron que: los mayores niveles de pureza se obtuvieron con los métodos extracción viroide convencional (EVC) y extracción fenol / tiocianato de guanidina (FTG) (sin contaminación de ADN, proteína y/o fenol), según los coeficientes 260/280nm y 260/230nm, mostrando valores para el ARN recuperado desde 1.9 a 2.0. Mientras que, los valores de pureza de ARN obtenidos con los métodos SDS/Acetato de Potasio (SAP) y Formaldehído/SSC (FS) fueron bajos (1.3-1.5). Por otra parte, los valores promedio de concentración de ARN obtenidos por cada método fueron: 7650ng/μL (FTG), 2330ng/μL (EVC), 2400ng/μL (FS) y 1217ng/μL (SAP).

Efecto del método de extracción de ARN en las técnicas RT-PCR, Northern Blot y Dot blot.

En la **Figura 1** se presenta un análisis comparativo de los métodos de extracción mediante las técnicas RT-PCR, Northern blot y Dot blot. Los perfiles de productos amplificados ADNc obtenidos a partir de RT-PCR y movilizadas electroforéticamente en geles de agarosa revelan que el genoma total del viroide *CEVd* (371pb) fue exitosamente recuperado y amplificado a partir de material vegetal a campo con los métodos EVC y FTG (muestra 1 y 3 limón “Lisbon” infectado con *CEVd*) (**Fig.1.A**). Para el mismo tejido infectado, las extracciones SAP y FS no mostraron bandas por RT-PCR (**Fig.1.A'**). Las muestras 2 y 4 (Limón Lisbón sin infección de viroides) no presentaron, en ninguno de los casos, productos de amplificación. Los controles positivos (carriles 5 y 6, cidro Etrog infectado con *CEVd* y el plásmido con el inserto del genoma completo de *CEVd* respectivamente) presentaron amplicones del tamaño esperado. Globalmente, este ensayo no generó amplificaciones inespecíficas para cada una de las reacciones, sin embargo, es de destacar que para otras variedades cítricas como cidro Etrog, mandarinas y naranjas fueron reveladas amplificaciones de este tipo (dato no mostrado). Por otro lado, se observó una banda tenue de bajo peso molecular

en el carril 8 (cidro sano, **Fig. 1.A y 1.A'**). Este amplicón no afectó los resultados, ya que no presenta el tamaño molecular esperado correspondiente al genoma de *CEVd*, sin embargo compromete la fidelidad de una interpretación diagnóstica.

Una particularidad de la técnica Northern blot para la detección de viroides implica que seguidamente a la migración del ARN en geles de poliacrilamida, se selecciona para la electrotransferencia a membrana, únicamente la región del gel que contenga los ARN de movilidad similar a las formas viroides tal como los que componen el complejo ARN ribosomal 7S. En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo dicho complejo no fue claramente detectado para algunos casos (**Fig.1.B**). A los efectos de identificar de forma aproximada la región del gel conteniendo ARNvd, se optó por recuperar un fragmento del gel que corresponde desde 1cm sobre los ARNs de bajo peso molecular del hospedero (ARN ribosomal 4S y 5S) hasta 2cm por arriba de este punto (líneas blancas de la **Fig.1.B**). La hibridación Northern Blot con sonda CEVd-DIG para la extracción EVC de la muestra 1, presenta una señal clara y compacta (nivel elevado de saturación, 132 UR) en la placa radiográfica (**Fig.1.B'**). Por otro lado, para las extracciones FTG, SAP y FS del mismo tejido infectado con *CEVd*, no se revelaron señales que indiquen la presencia del viroide de la exocortis para estos métodos ensayados y para esta herramienta de hibridación molecular (~30 UR), ya que en ninguno de estos casos las intensidades fueron mayores al punto *cut-off* o límite de detección (~80 UR) el cual representa el doble de la intensidad detectada en el control negativo. El control positivo (cidro CEVd-17) presenta una señal positiva esperada. El análisis ARN Dot blot reforzó lo observado en la **Figura 1.B'**, ya que la muestra obtenida con el método EVC mostró una señal evidente para la muestra 1 infectada (**Fig.1.C**) y no se obtuvieron señales claras con las muestras obtenidas con los otros métodos de recuperación de ARN viroide. Sin embargo el método Formaldehído/SSC presentó una leve señal (posición 3, **Fig.1.C**) y una señal difusa de tipo arrastre (carril 3, **Fig.1.B'**). Estas intensidades de señal observadas no son comparables en cuanto a fidelidad con la señal emitida por el método EVC, ni para el control positivo cidro CEVd-17(**Fig.1.D**).

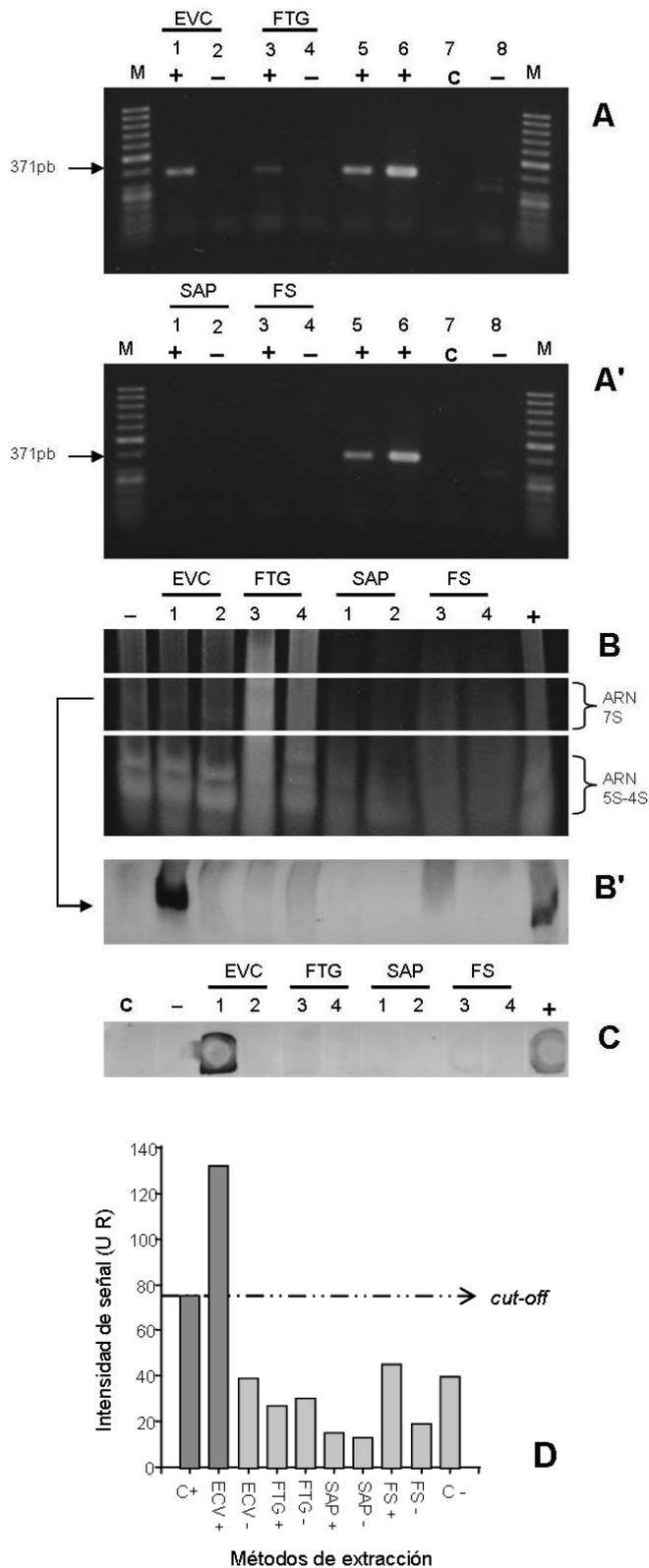


Fig.1. Análisis comparativo de diferentes métodos de extracción de ARN viroide mediante RT-PCR con cebadores *CEVd*, Northern Blot y Dot Blot con sondas *CEVd*-DIG.

A y A'. RT-PCR para *CEVd* del método EVC, FTG, SAP y FS diluidos 1/50. Carriles 1, 3 corresponden a la muestra de campo Limón K395 infectado con *CEVd*, carriles 2 y 4 muestra Limón CDL384 sin infección viroide. Carril 5, cidro Etrog infectado con *CEVd*-17, carril 6, ADN*CEVd* 054.11, carril 8 cidro Etrog sano. Carril C, control mix de reacción. M, marcador de peso molecular 50pb

B. Electroforesis PAGE al 5% y tinción con bromuro de etidio de extracciones EVC, FTG, SAP y FS (los números corresponden con el tipo de muestra de la figura A y A'). Carril - cidro sano, carril + cidro infectado con *CEVd*-17 (EVC). Recorte de la zona de movilidad de las formas viroides circular y lineal (líneas en B) para electrotransferencia en membranas N⁺ y posterior hibridación Northern Blot.

B'. Autorradiografía de hibridación Northern Blot con sonda *CEVd*-DIG de muestras transferidas de PAGE B.

C. Hibridación Dot Blot de ARN obtenido de los métodos EVC, FTG, SAP y FS (los números corresponden con el tipo de muestra de la Figura B y B') carril - cidro sano, carril + cidro infectado con *CEVd*-17, carril C, H₂O.

D. Gráfica de valores de intensidad de señal (Unidades Relativas) obtenidas en la hibridación Northern Blot de la figura 1.B' contra el método de extracción de ARN utilizado. La línea punteada indica el límite de corte que revela la mínima señal que se ratifica como positiva y que representa el doble de la intensidad relativa del control negativo (C-) (ver figura 4).

Sensibilidad y eficiencia del método Northern Blot en la detección individual o de mezclas de viroides en tejido infectado

En una primera etapa se analizó el nivel de sensibilidad y punto de saturación del método Northern Blot para la detección de los viroides Citrus exocortis viroid (*CEVd*), Citrus bent leaf viroid (*CBLVd*), Hop stunt viroid (*HSVd*) y Citrus dwarfing

viroid (*CDVd*) infectando una planta de limón “Lisbon” de referencia utilizando como sonda una mezcla de los ADNc de los cuatro viroides marcadores con digoxigenina. Seguidamente, se evaluó la eficiencia de este método y el punto de presencia/ausencia o *cut off* en el diagnóstico de los viroides *CEVd* y *HSVd* en muestras de plantas de cuatro variedades cítricas (naranja, mandarina, limón, pomelo) colectadas en predios comerciales y/o estaciones experimentales, determinando el límite de detección del método.

Sensibilidad del método para diagnóstico viroide

El análisis de sensibilidad de la técnica Northern blot y las sondas marcadas para el diagnóstico de viroides en material vegetal de campo (*Citrus limon*) se presentan en la **Figura 2.A**. El tejido vegetal depositado en cada pocillo va desde los 333mg hasta los 8mg (en microlitros de ARN de 20µL a 0.5µL). Las señales producidas por la formación de híbridos ARNvd-ADNcDIG, obtenidos por la hibridación con una mezcla de sondas en la misma solución de hibridación, mostraron que el límite de detección (la mínima concentración de ARN objetivo o *target* que presenta una señal detectable visualmente por la técnica) es de 1513ng (0.5µL) a 1009ng (0.75µL) de ARN total, en estas condiciones se asoció a un rango de 8mg a 12mg de tejido procesado, el cual mostró señales positivas en todos los casos de tejido infectado analizado. Sin embargo, la muestra vegetal naranjo Washington Navel sin infección, equivalente a 57425ng de ARN (25µL) no presentó señal. La representación gráfica de los niveles de saturación de las señales generadas por autoradiografía de las diferentes concentraciones de ARN se presenta en la **Figura 2.B**, mediante un análisis de regresión y una gráfica de dispersión.

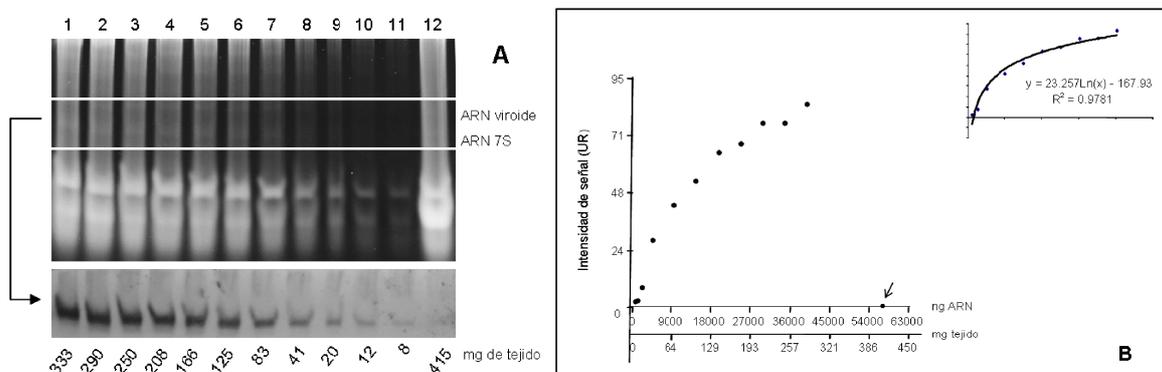


Fig.2. Análisis de sensibilidad de la técnica Northern blot para la detección de los viroides en planta a campo (*Citrus limon*) utilizando una mezcla de sondas ADNc marcadas con digoxigenina de cuatro viroides cítricos e identificación de los niveles de saturación de la autorradiografía **A.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de ARN obtenido por EVC. El segmento de la zona de movilidad viroide (entre las líneas blancas) fué recortado para electrotransferencia a membranas N⁺ y posterior hibridación con una mezcla de sondas CEVd-CBLVd-HSVd-CDVd-DIG y autorradiografía correspondiente (señalado con una flecha). Carril 1 al 11, muestra limón Lisbon PE390 infectado con los viroides *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd* (carga en cada pocillo de 40360, 35315, 30270, 25225, 20180, 15135, 10090, 5045, 2522, 1513 y 1009 ng de ARN del floema, respectivamente) carril 12, muestra sana de naranjo Washington Navel PEWN01 correspondiente a 57425 ng de ARN. **B.** Niveles de saturación de la señal de hibridación en la autorradiografía obtenida. Gráfica de dispersión y análisis de regresión de valores de intensidad de señal frente a nanogramos de ARN o miligramos de tejido procesado en base a los resultados obtenidos de la hibridación Northern Blot de la figura 2.A. Nótese que el punto que hace referencia a 0 UR (57425ng o 415 mg) es el control negativo del ensayo (indicado con una flecha).

Los valores de unidades relativas de intensidad de señal medidos según el parámetro de corrección de *background* (control negativo del ensayo es igual a 0 UR) mostraron que las señales superiores a 0 UR son tomadas como detectables (2 UR a 83 UR, correspondientes a 8mg y 333mg de tejido fresco), siguiendo una tendencia positiva explicada por el modelo logarítmico y ajustado con un índice de correlación de $R^2 = 0.9781$. Es decir, se pone en evidencia que los valores de intensidad de señal comprendidas en el rango de cantidad de ARN analizado (o tejido procesado) están asociados mediante un modelo logarítmico con la cantidad de ARN objetivo presente en la muestra al no haberse alcanzado aún un nivel de saturación.

Eficiencia y punto límite de presencia/ausencia del método diagnóstico viroide Northern blot en variedades cítricas de campo.

La eficiencia o aplicabilidad Northern blot como herramienta molecular de diagnóstico informativo en diferentes variedades cítricas colectadas en diversas regiones del país se estudio mediante la detección de los viroides *CDVd* y *HSVd*. De manera representativa, se analizaron 14 plantas de las cuales están incluidos naranjo, limón, mandarina y pomelo. Además se incluyó en el análisis una planta sana de cidro Etrog (control negativo) y una planta de cidro Etrog infectada con *HSVd* (control negativo de *CDVd*, dado la baja homología entre ambos viroides). Como sondas se utilizaron secuencias de ADNc conteniendo el genoma completo de *CDVd* o *HSVd*, marcadas con digoxigenina, en forma individual.

Tal como se muestra en la **Fig 3.A**, el viroide *CDVd* fue nítidamente detectado en todas las muestras hibridadas con la sonda *CDVd-DIG*, excepto una planta de Naranjo Washington Navel (PEWN04), una de limón “Lisbon” (FB380) y el cidro Etrog infectado con *HSVd*. En cambio, el viroide *HSVd* (**Fig.3.B**) fue detectado en todas

las muestras analizadas con excepción, como era esperable, de la correspondiente al cidro Etrog sano. Considerando el análisis por densitometría de las autorradiografías obtenidas, se observa que los controles negativos utilizados en cada ensayo presentaron un valor de intensidad de señal entre 10 UR a 30 UR, mientras que aquellas señales consideradas positivas (presencia del viroide) por inspección visual de la autorradiografía (**Fig.3**) presentaron variaciones en la cuantificación de la señal en un rango de 62 UR a 160 UR (**Fig.4**). El punto límite (*cut-off*) de ausencia/presencia de señal o infección (según los parámetros de *background* estimado por la imagen) en este experimento, basados en el criterio de que una muestra infectada debe mantener el doble del mayor valor de la intensidad de la muestra control negativa (con el fin de ubicar un intervalo de aceptación para una señal positiva) sería alrededor de 60 UR. De esta manera, se puede concluir que todas las muestras con señales visualmente identificables en la placa autorradiográfica se encuentran en el intervalo aceptado de identificación, indicando positivamente su estatus de infectadas. Para el caso de las muestras PEWN04 y FB380 (muestras 2 y 8 respectivamente, **Fig.4**) no puede asegurarse, de manera confiable, su infección al presentar señales con intensidades menores al *cut-off* (~60UR) definidas como presencia de infección. Lo anterior es reforzado mediante la comparación de miligramos de tejido procesado en la extracción EVC (333mg como máximo recomendado) para las muestras que mostraron señal y la misma cantidad de tejido procesado para las que evidencian señales inferiores a 60 UR.

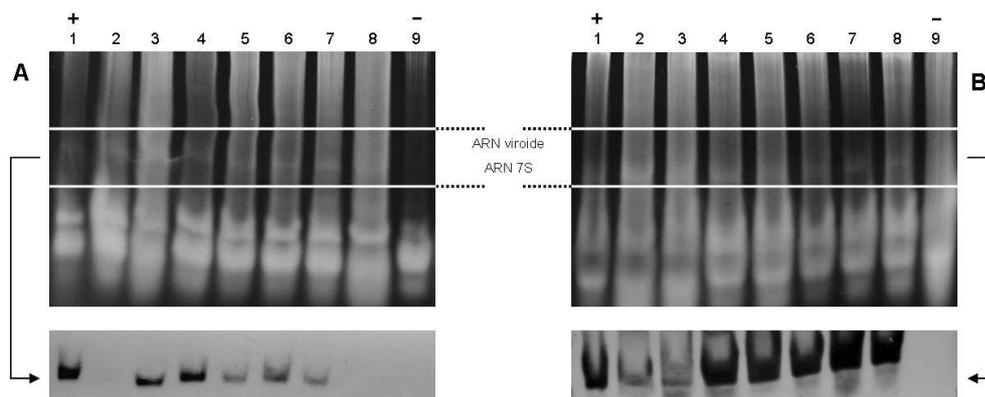


Fig.3. Ensayo de eficiencia de la técnica Northern blot para muestras colectadas a campo. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los ARN obtenidos por EVC a partir de 333mg de tejido. El segmento del gel de la zona de movilidad viroide (líneas blancas) fue recortado, electrotransferido e hibridado con sonda marcada CDVd-DIG (A) y HSVd-DIG (B). **A.** Carril 1, Naranja Washington Navel infectado con *CDVd* (PEWN02), carril 2, Naranja Washington Navel (PEWN04), carril 3 y 4, Limón (K393, K395), carril 5, mandarina (GS430), carril 6, naranja Valencia (PqL1S175), carril 7, mandarina (FAgS437), carril 8, limón (FB380), carril 9, cidro Etrog 006 infectado con *HSVd*. **B.** Carril 1, ARN 1124-SIVIA conteniendo los viroides *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, carril 2 y 3, pomelo (G031,G054), carril 4 y 5, Limón (FB410, FB411), carril 6, mandarina (GS430), carril 7, limón (PE390), carril 8, Naranja Washington Navel (MolWN01), carril 9, cidro Etrog sano.

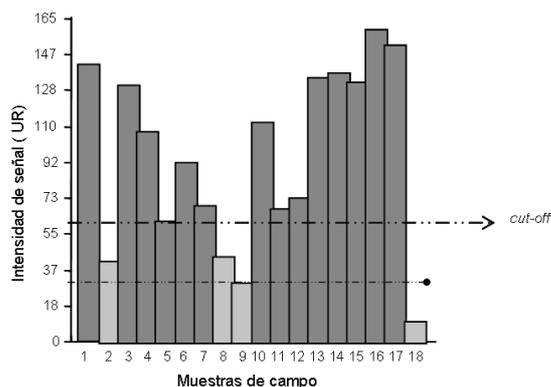


Fig.4. Gráfica de valores de intensidad de señal (Unidades Relativas), obtenidas en la hibridación Northern blot de la figura 3.A (*CDVd*) y 3.B (*HSVd*) en 14 plantas cítricas muestreadas de montes en producción Las muestras 9 y 18 son los controles negativos del ensayo, las muestras restantes pertenecen a los diferentes materiales analizados de la figura 3 (1-9 = 1-9 de la Fig. 3. A y 10-18 = 1-9 de la Fig.3.B). La línea punteada superior indica el límite de corte que revela la mínima señal (*cut-off*) que se ratifica como positiva (muestra 5) según el criterio de que la intensidad aceptada para una muestra infectada debe representar una intensidad de por lo menos el doble del mayor valor de la intensidad de la muestra control negativa (muestra 9, línea punteada inferior).

Capitulo 2. Herramientas moleculares PCR y transcripción reversa para la síntesis y verificación de secuencias completas del genoma de *CBCVd* y *CVd-VI*.

Reconocimiento de identidad y generación de plásmidos recombinantes control.

Con el fin de verificar la identidad de los insertos de los plásmidos recombinantes pCR2.1TS47 y pCR2.1S10SEILabb cedidos por el Dr. Takao Ito del NIFTS, Japón, se realizó un estudio de alineamiento e identidad de las secuencias obtenidas por secuenciación contra las secuencias reportadas en el GenBank. Los resultados obtenidos mostraron que los insertos analizados efectivamente correspondían a los genomas completos de las especies viroides *CBCVd* y *CVd-VI* (acceso en GenBank *AB054635.1* y *AB054602.1*), respectivamente. Los plásmidos pCR2.1TS47 y pCR2.1S10SEILabb fueron entonces utilizados para transformar células quimiocompetentes y electrocompetentes de *E.coli* para almacenamiento y disposición de controles positivos en volumen. De las transformaciones con el plásmido pCR2.1TS47 se obtuvieron los clones 1, 3 y 4; mientras que con el plásmido pCR2.1S10S se recuperaron los clones 1 y 3. El ADN plasmídico extraído de cada clon fue analizado por PCR, confirmándose la presencia de los insertos mediante los

productos de amplificación de 286pb para el caso del pCR2.1TS47 y 329pb para pCR2.1S10S. De acuerdo a las amplificaciones por PCR y al análisis de alineamiento e identidad desarrollados a partir de los resultados de secuenciación (92% de identidad con *AB054635.1* y 98% de identidad con *AB054602.1*) se determinó que el pCR2.1TS47 presente en clon 4 respectivo (ahora en mas denominado TS47.4) y el pCR2.1S10S presente en el clon 1 (S10S.1) poseen efectivamente el genoma completo de las especies viroides *CBCVd* y *CVd-VI*, respectivamente.

Ajuste de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Gradiente de temperatura

La identificación de la temperatura de máxima astringencia en el apareamiento de cebadores específicos en la (PCR) es un paso relevante para la amplificación del genoma completo de viroides a partir de ADNc molde. Dicha temperatura sería la mayor a la cual no se detecten amplificaciones inespecíficas ni reacción cruzada con plásmidos recombinantes de otros viroides cítricos. Las temperaturas ensayadas mediante reacción de amplificación con gradiente térmico en la temperatura de apareamiento (entre los 58°C y 65°C) dirigido a los plásmidos pCR2.1TS47 y pCR2.1S10S, determinaron un leve descenso en la intensidad de la banda con respecto al incremento de la temperatura (**Fig.5.A** y **Fig.6.A**). Las muestras de plásmidos con función discriminante (ADNc viroide con secuencia de elevada similitud con el genoma de los viroides blanco de este estudio) empleadas como ADN molde frente a los cebadores dirigidos a *CBCVd* (ADNp CEVd 054.11) y *CVd-VI* (ADNp CDVd III) no presentaron bandas ni amplificaciones del tamaño molecular de 286pb ni 329pb (carril 11 de las figuras 5.A y 6.A), de manera similar para los productos de PCR igualmente discriminantes empleados como ADN molde (carril 12 en ambas figuras). Se determinó la temperatura óptima de reacción para las especies *CBCVd* y *CVd-VI* con el criterio de alta astringencia, estableciendo que a 64°C las reacciones de amplificación con los cebadores específicos CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+) y CB3-CM (-) / CB3-CP (+) no mostraron bandas inespecíficas ni amplificaron para plásmidos recombinantes con el inserto de *CEVd* o *CDVd*, por otro lado, la estabilidad de los cebadores según el porcentaje de su conformación G:C es acorde con la temperatura seleccionada.

Ajuste de la transcripción reversa-PCR para las especies *CBCVd* y *CVd-VI*.

Abordaje primario.

Mediante los resultados obtenidos en la determinación de la temperatura de apareamiento de los cebadores específicos y de acuerdo con los datos obtenidos en el capítulo 1 sobre los métodos de extracción que permiten una eficaz retrotranscripción del genoma viroide desde material vegetal infectado, se resolvió ensayar las transcripciones reversas para los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* con las extracciones FTG y EVC para material cidro infectado y así abordar de manera primaria el objetivo de recuperar el genoma completo viroide de tejido infectado. Las figuras 5.B y 5.C revelaron que la muestra 804 (carril 3 y carril 4 respectivamente para cada figura) amplificó el genoma de *CBCVd* (286pb). Los controles positivos de reacción PCR: el plásmido pCR2.1TS47 (carril 4, Fig.5.B) y los clones TS4.7.1 y TS47.4 (carriles 6 y 7, Fig.5.C) presentaron bandas del tamaño esperado. Los controles negativos de reacción RT y PCR no generaron amplicones (mix de reacción RT y PCR sin ARN ni ADN molde en las figuras 5.B y 5.C, carril 5). Sin embargo, muestras de cidro infectadas con diferentes combinaciones de viroides (161 y 152B-006, carril 2 en 5.B y carriles 1-2 en 5.C respectivamente) presentaron bandas con una movilidad electroforética aproximada al tamaño del genoma ADNc de *CBCVd*, mientras tanto, todas las transcripciones reversas revelaron amplificaciones inespecíficas, en algunos casos imperceptibles.

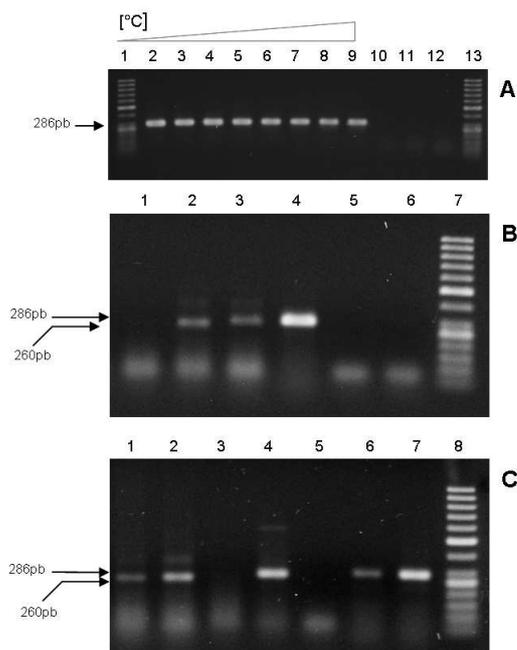


Fig.5. Ajuste de la reacción PCR utilizando plásmidos recombinantes con inserto del genoma total de *CBCVd* mediante reacción con gradiente de temperatura y RT-PCR con cebadores específicos utilizando el método de extracción EVC o FTG en cidros Etrog infectados. **A.** Electroforesis de productos PCR del plásmido pCR2.1TS4.7 con cebadores CVIV-CM (-) y CVIV-CP (+). Carriles del 2 al 9 gradiente de temperatura de 58°C a 65°C aumentando un grado por reacción, carril 10, mix de reacción sin ADN, carril 11, pCEVd 054.11, carril 12, producto de amplificación *CEVd* utilizado como ADN molde, carriles 1 y 13, marcador de peso molecular 50pb. **B.** Productos de RT-PCR de muestras cidro infectadas (Método EVC). Carril 1, cidro 161 (*HSVd-CDVd*), carril 2, cidro 152B (*HSVd*), carril 3, cidro 804 (*CBCVd*), carril 4, pCR2.1TS47, carril 5 y 6 mix de reacción RT y PCR sin ARN ni ADN molde, carril 7, marcador de peso molecular 50pb. **C.** Productos de RT-PCR de muestras cidro infectadas (método FTG). Carril 1, cidro 161 (*HSVd-CDVd*), carril 2, cidro 006 (*HSVd*), carril 3, cidro 152B (*HSVd*), carril 4, cidro 804 (*CBCVd*), carril 5, mix de reacción RT sin ARN, carril 6, pCR2.1TS4 clon 1, carril 7, pCR2.1TS4 clon 4, carril 8, marcador de peso molecular 50pb.

Las muestras de cidro infectado con diferentes combinaciones de viroides (S370, AM1, 006,152B) mostraron amplificaciones con distintos niveles de intensidad para la RT-PCR frente a cebadores específicos para la detección de *CVd-VI* (**Fig.6.B** carriles 4, 5, 6 y 7). Sin embargo, el producto de PCR que amplifica el genoma ADNc completo del viroide *CVd-VI* (329 pb, carril 8) no mantuvo la misma movilidad de los amplicones de las muestras S370, AM1, 006,152B (350 pb). Las muestras cidro infectadas 006, AM1, 161,152B y S370 fueron sometidas a un ensayo Northern Blot con sondas marcadas CBCVd-DIG y CVd-VI-DIG. El material vegetal analizado no mostró señales positivas que confirmaran la presencia de las especies *CBCVd* y *CVd-VI* en este tejido (dato no mostrado). Este análisis nos conduce a realizar una evaluación de la técnica RT-PCR hasta el punto de ajuste, tomando en cuenta la no disponibilidad de material vegetal infectado con el viroide *CVd-VI* y la disponibilidad de únicamente tejido cidro infectado con *CBCVd*. Sin embargo, previamente, se ejecuta un análisis de identidad de las amplificaciones inespecíficas reveladas en el anterior abordaje primario, ya que estos amplicones pueden confundir la interpretación de ausencia/presencia del patógeno debido a su similitud en cuanto a peso molecular revelado por movilidad electroforética en soporte de agarosa comparado a un marcador de peso molecular definido.

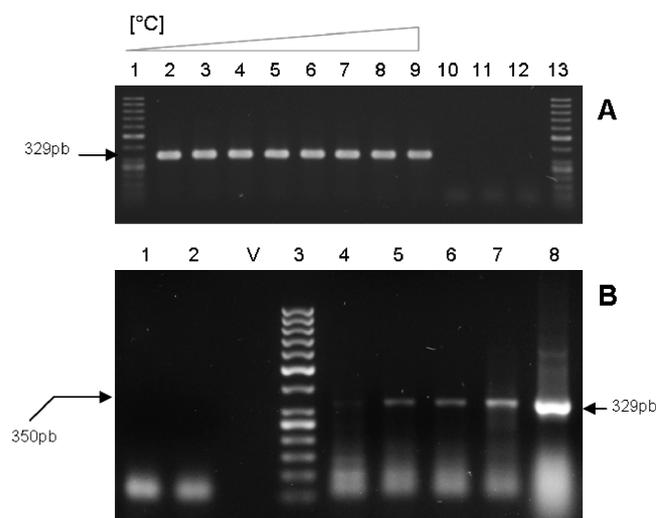


Fig.6. Ajuste de la reacción PCR utilizando plásmidos recombinantes con inserto del genoma total de *CVd-VI* mediante reacción con gradiente de temperatura y RT-PCR con cebadores específicos utilizando el método de extracción EVC en cidros Etrog infectados. **A.** Electroforesis de productos PCR del plásmido pCR2.1S10S con cebadores CB3-CM (-) y CB3-CP (+). Carriles del 2 al 9 gradiente de temperatura de 58°C a 65°C aumentando un grado por reacción, carril 10, mix de reacción sin ADN, carril 11, pCDVd III, carril 12, producto de amplificación *CDVd* utilizado como ADN molde, carriles 1 y 13, marcador de peso molecular 50pb. **B.** Productos de RT-PCR de muestras cidro infectadas. Carril 4, cidro S370 (*CEVd-CDVd*), carril 5, cidro AM1 (*CEVd-HSVd-CDVd*), carril 6, cidro 006 (*HSVd*), carril 7, cidro 152B (*HSVd*), carril 8, pCR2.1S10S clon 1, carril 1 y 2 mix de reacción RT y PCR sin ARN ni ADN molde, carril V, sin siembra, carril 3, marcador de peso molecular 50pb.

Reconocimiento de la identidad de amplificaciones inespecíficas obtenidas por RT-PCR.

Los amplicones obtenidos del tejido cidro 804, 006, 152B, 161 y S370 generados por RT-PCR (**Fig.5.B, 5.C y 6.B**) fueron purificados y secuenciados en dos direcciones con cebadores específicos CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+) y CB3-CM (-) / CB3-CP (+). Las secuencias reveladas confirmaron, mediante BLASTn, que el amplicón 804 generado por RT-PCR, recuperado y secuenciado posee la secuencia completa del viroide *CBCVd* (accesión en GenBank *AJ630360.1*). Sin embargo, diversas características de identidad de secuencia fueron observadas para los amplicones 006 del ensayo 6.B (350pb, identidad con *CVd-VI* pero secuencia similar al clon 1 de pCR2.1S10S). La secuencia del fragmento amplificado 006, mostró, según análisis BLASTn, que la identidad que posee el amplicón es la del genoma completo de *CVd-VI*. Sin embargo, mediante ensamblaje con el programa Sequencher® entre la secuencia 006 y la secuencia obtenida del clon S10S.1, se observa una elevada similitud (únicamente 8 discordancias y agrupadas en una región). Por otro lado, un ensayo *in silico* con BLASTn *2sequences* reveló que un alineamiento del producto PCR 006 con el genoma completo de *CVd-VI* (Accesión *AB054602*) presentó una cobertura de solamente un 83%, lo contrario del alineamiento del clon S10S.1 con PCR 006 que presentó un 99% de cobertura entre sus bases. Fueron observadas particularidades en la identidad de secuencia del producto de S370 (identidad con *CBCVd* pero secuencia similar al clon 4 de pCR2.1TS47), el amplicón 152B (260pb, identidad en un 81% con una zona (3986pb-3733pb) de la proteína vacuolar de la familia VPS de *Ricinus communis*, Accesión: *XM_002519243.1*) y un 80% de identidad con una zona (4142pb-3889pb) de una proteína predicha de *Populus trichocarpa*, Accesión: *XM_002311329.1*). El producto de PCR 161 (260pb, identidad en un 84% y 83% con las zonas 3980pb-3733pb de *XM_002519243.1* y 3889pb-4124pb de *XM_002311329.1* respectivamente). Lo anterior indica que las amplificaciones inespecíficas obtenidas desde el material vegetal de origen 006, S370, 152B y 161 no pertenecen al genoma ADNc completo de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* infectando este tejido.

Para dilucidar los posibles acoplamientos o hibridaciones inespecíficas entre los cebadores empleados para la amplificación del genoma de *CBCVd* y ARN del hospedero, basándonos en los resultados de alineamiento obtenidos anteriormente, se

realizaron diferentes análisis *in silico* mediante ensamblaje automático, alineamiento múltiple y simple con dos secuencias. Un ensamblaje automático (Sequencher® 4.9) con parámetros de acoplamiento del software de un 60% de apareamiento y 20% de solapamiento, mostraron que los cebadores CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+) se logran hibridar en la zona del ARNm que comparte la identidad de los fragmentos RT-PCR secuenciados. Se debe tomar en cuenta que estos mismos cebadores consiguieron ensamblarse *in silico* con el genoma completo de *CBCVd* mediante parámetros de 100% de apareamiento y 10% de solapamiento (elevada rigurosidad de acoplamiento). El alineamiento múltiple con Clustal W indicó que la zona de identidad que comparte *Populus trichocarpa* con los amplicones inespecíficos generados por RT-PCR con cebadores para *CBCVd* se alinea con 13 de los 20-22nt que conforman estos últimos (CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+)). Lo mismo sucede con 12 de los 20-22nt para el caso de la zona de *Ricinus communis* que comparte identidad con el amplicón. En los dos casos las uniones *in silico* entre cebador y zona de identidad fueron de manera discontinua. Un análisis Blastn 2sequences mostró que los cebadores CVIV-CM (-) / CVIV-CP (+) hibridaron en un 88% de identidad con la accesión XM_002519243.1, zona 3986pb y 3733pb de la secuencia de *Ricinus communis*. Los ensayos anteriores indican que los cebadores específicos podrían aparearse con zonas inespecíficas del ARN del hospedero provocando amplificaciones erráticas para la técnica RT-PCR en nuestras condiciones.

Ajuste de la técnica RT-PCR.

Los ensayos RT-PCR ejecutados sobre diferentes ARN blanco para detectar y recuperar el genoma ADNc completo de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* fueron ajustados y validados. Los amplicones generados mediante reacciones de transcripción reversa para las muestras de cidro 804, CEVd-17, LE.1FAg, 161 y cidro sano se observaron en la **Figura 7.A** con cebadores para *CBCVd*. Las muestras 804 y LE.1FAg presentaron una banda del tamaño esperado y leves amplificaciones inespecíficas de bajo peso molecular. Los cidros CEVd-17, 161 y cidro sano no presentaron amplicones. En la **Figura 7.B** se observó que los cidros 006, 161 y cidro sano no mostraron bandas que indiquen la presencia del viroide *CVd-VI*. Los transcritos monoméricos sintetizados a partir de ADNc de plásmidos recombinantes con el inserto de *CBCVd* y *CVd-VI* (ver capítulo 3, Figura 12) del clon 4 de pCR2.1TS47 (ARNcTS47.4) y clon 1 de pCR2.1S10S (ARNcS10S.1) utilizados en este ensayo como controles positivos adicionales (**Fig.7.A**, carril 6 y **Fig.7.B**, carril 5) generaron amplicones de movilidad

electroforética esperada de manera similar que los controles positivos de reacción (carril 8 en 7.A y carril 6 en 7.B).

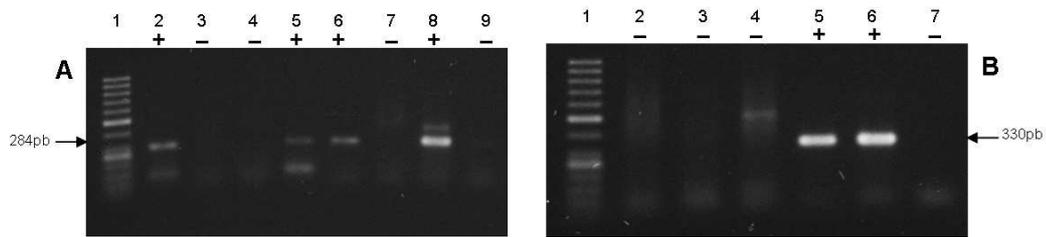


Fig. 7. Productos de RT-PCR de muestras cidro Etrog extraídas con el método EVC. **A.** RT-PCR con cebadores para *CBCVd*. Carril 2, cidro 804 (*CBCVd*), carril 3, cidro sano, carril 4, cidro CEVd-17, carril 5, cidro infectado con *CBCVd* (LE.1FAg), carril 6, ARNc TS47 clon 4, carril 7, cidro 161(*HSVd-CDVd*), carril 8, control positivo de reacción (producto de amplificación *CBCVd* utilizado como ADN molde), carril 9, mix de reacción RT sin ARN molde. **B.** RT-PCR con cebadores para *CVd-VI*. Carril 2, cidro infectado con *HSVd* (006), carril 3, cidro sano, carril 4, cidro 161(*HSVd-CDVd*), carril 5, ARNc S10S clon 1, carril 6, control positivo de reacción (producto de amplificación *CVd-VI* utilizado como ADN molde), carril 7, mix de reacción RT sin ARN molde, carril 1, marcador de peso molecular 50pb.

Para la validación de los productos de RT-PCR observados en la figura 7.A y 7.B se llevó a cabo una hibridación con sondas específicas marcadas para detectar el genoma de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* mediante un ensayo Southern blot (**Fig.8**). Los amplicones RT-PCR electrotransferidos a membrana de los cidros infectados 804 y LE.1FAg (numeral 2 y 5) mostraron señales en la placa radiográfica, de igual manera que el ARNcTS47.4 y el control positivo de reacción (numeral 6 y 8). Las reacciones de transcripción reversa para las muestras CEVd-17, 161 y cidro sano (numeral 4, 7 y 3) no presentaron señales positivas (**Fig.8.A**). En la **Figura 8.B** se observó que las reacciones de las muestras 006, 161 y cidro sano (numeral 2, 4 y 3) no reflejaron ninguna señal de hibridación con la sonda *CVd-VI*-DIG. Por otro lado, se diferenciaron señales con elevada intensidad en el carril numerado con 5 (ARNc S10S.1) y numeral 6 (producto de amplificación *CVd-VI* utilizado como ADN molde).

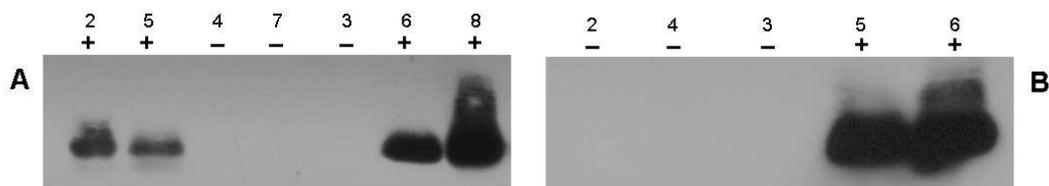


Fig.8. Southern Blot de productos de RT-PCR *CBCVd* y *CVd-VI* movilizados electroforéticamente en gel de agarosa al 1%, electrotransferencia en membranas N⁺ e hibridación con sonda *CBCVd*-DIG (A) y *CVd-VI*-DIG (B). **A.** Los carriles numerados con 2, 5, 4, 7, 3, 6 y 8 corresponden a las muestras con el mismo número de la figura 7A. **B.** Los carriles numerados con 2, 4, 3, 5 y 6 corresponden a las muestras con el mismo número de la figura 7B.

Capítulo 3. Caracterización de sondas marcadas DIG-11-dUTP y determinación de parámetros diagnósticos de las especies *CBCVd* y *CVd-VI* para el análisis de rutina en material de campo.

Elaboración y caracterización de sondas moleculares para el diagnóstico de *CBCVd* y *CVd-VI*.

Eficiencia del marcaje en frío (sondas no-isotópicas).

Los productos de PCR obtenidos a partir de 325pg de cada uno de los plásmidos recombinantes pCR2.1TS47 y pCR2.1S10S EILabb se marcaron con digoxigenina en la misma reacción de amplificación, como se observa en la **Figura 9** para el caso de la sonda *CBCVd*-DIG. Los productos marcados (carriles 3 y 4), presentan una movilidad electroforética menor que el amplicón sin incorporación de DIG-11-dUTP (carril 2, 286pb). Las sondas marcadas muestran una intensidad menor que el control de reacción sin DIG-11-dUTP (**Fig.9.A**). La cuantificación aproximada mediante espectrofotometría UV del ADNc marcado del genoma completo de los viroides proyectó valores de 419ng/μL y 383ng/μL para las sondas *CBCVd*-DIG y *CVd-VI*-DIG respectivamente. La eficiencia del marcado de la sonda se evaluó mediante la fijación en membranas de diferentes concentraciones de sonda marcada, contra las mismas concentraciones de ADN control con óptima eficiencia en el marcado (Roche™).

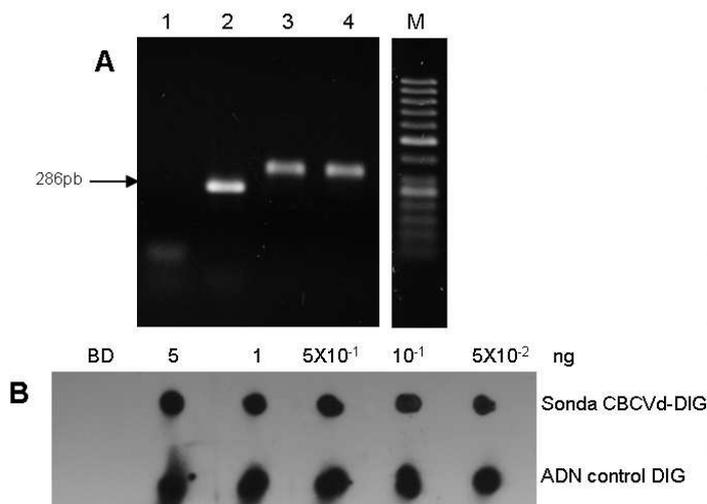


Fig. 9. Sonda *CBCVd* marcada con DIG-11-dUTP mediante PCR de plásmido pCR2.1TS47 diluido y ensayo de eficiencia del marcaje no radioactivo respecto a un control ADN plasmídico lineal marcado **A**. Electroforesis en agarosa al 1.5% de productos de PCR con y sin sustitución de digoxigenina por dTTP en el amplicón resultante. Carril 1, mix de marcaje DIG sin ADN molde, carril 2, sonda *CBCVd* control sin DIG, carriles 3 y 4, sonda *CBCVd* marcada con DIG. M, marcador de peso molecular 50pb. **B**. Dot blot de sonda *CBCVd* marcada con DIG y control ADN marcado con DIG (Roche™). Detección con Ac-DIG-AP y CSPD. Diluciones de *CBCVd*-DIG y ADN control-DIG con Buffer de Dilución (BD) sembradas en membrana de nylon cargada positivamente (5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 ng respectivamente).

Los resultados del ensayo Dot blot (**Fig.9.B**) muestran que la mínima concentración ensayada para la sonda *CBCVd* (0.05ng) mantiene una intensidad de señal similar que la concentración del ADN-DIG del orden de 5X10⁻²ng. Resultados equivalentes fueron

obtenidos para la sonda CVd-VI-DIG (dato no mostrado). Lo anterior demuestra que las sondas *CBCVd* y *CVd-VI* elaboradas, presentaron un marcaje satisfactorio en cuanto a la incorporación de digoxigenina en el genoma completo de ADNc viroide.

Determinación de las uniones entre sondas CBCVd y CVd-VI frente a ADNc de viroides cítricos.

Para determinar las posibles uniones de las sondas ADNc sintetizadas frente a ADNc de genomas completos viroides que presentan diferentes grados de similitud de secuencia con *CBCVd* y *CVd-VI* se llevó a cabo un ensayo Southern blot con sondas *CBCVd-DIG* y *CVd-VI-DIG* hibridadas sobre membranas que mantienen fijadas amplificaciones doble hebra de todos los viroides cítricos disponibles. El análisis presenta, para la sonda *CBCVd-DIG* aplicada, que los genomas totales ADNc de *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd* y *CVd-VI* no generaron señales significativas (19 UR en promedio). Sin embargo son visibles leves señales para los genomas *CEVd* y *HSVd* (carriles 1 y 3 de la **Fig.10.A**), las cuales no se comparan en intensidad con la señal que forma el híbrido *CBCVd-DIG:CBCVd-ADNc* (carril 6, 160 UR, **Fig.10.A y 10.C**). Para la sonda *CVd-VI-DIG* aplicada a los genomas totales ADNc de los viroides *HSVd*, *CDVd* y *CBCVd* se observan leves señales (carriles 3, 4 y 6, promediando 32 UR). Sin embargo, cuantitativamente, estas señales no son similares a la intensidad de la señal generada por la hibridación con el genoma *CVd-VI* (carril 5, 150 UR, **Fig.10.B y 10.D**). Los amplicones tipo microsatélites, provenientes del cromosoma 2H de cebada (154pb, carril 7) y cromosoma 3H de cebada (380pb, carril 8) utilizados como controles de *background*, no generaron señales para ninguna de las sondas marcadas (**Fig.10.A y 10.B**). Los resultados anteriores demuestran que las uniones inespecíficas entre las sondas ADNc *CBCVd* y *CVd-VI* con genomas completos ADNc de algunos viroides cítricos son posibles. Sin embargo, la intensidad de estos apareamientos imperfectos no presenta la misma eficacia de unión que se observa en los híbridos específicos de ADNc:sonda de *CBCVd* o *CVd-VI*. Para explicar las uniones imperfectas observadas en el ensayo Southern blot se realizó un análisis *in silico* utilizando el programa *Blast2 sequences* del servidor NCBI. Este ensayo mostró las similitudes de secuencias entre todos los viroides cítricos, lo cual deduce los posibles apareamientos imperfectos que podrían generar las señales observables en las hibridaciones (**Tabla 2**).

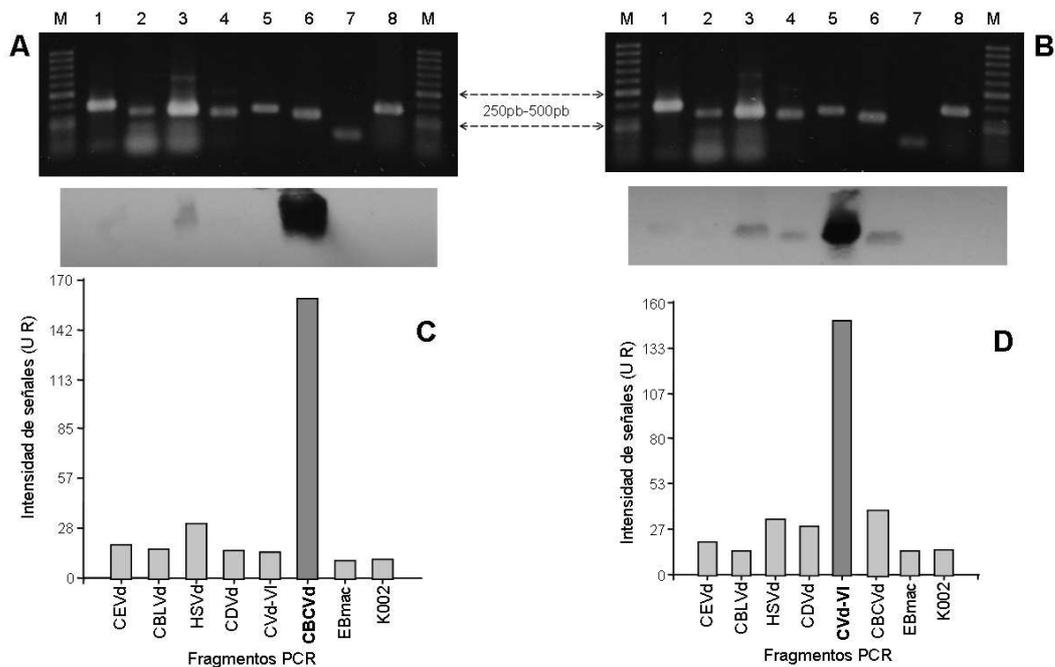


Fig.10. Ensayo de hibridación de las sondas marcadas *CBCVd* y *CVd-VI* frente a diferentes productos de PCR que poseen diversos niveles de similitud de secuencia y apareamiento de bases. **A.** Sonda *CBCVd*. Carril 1, 2, 3, 4, 5, 6, ADNc del genoma completo de *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, *CVd-VI* y *CBCVd*, carril 7, EBmac623.1, carril 8, K00212. **B.** Sonda *CVd-VI*. Carril 1, 2, 3, 4, 5, 6, ADNc del genoma completo de *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, *CVd-VI* y *CBCVd*, carril 7, EBmac623.1, carril 8, K00212. Carril M, MPM 50pb. **C y D.** Gráficas de valores de intensidad de señal (U R) obtenidas en el ensayo Southern Blot (A y B) contra el ADNc de los genomas de todos los viroides cítricos y dos fragmentos PCR aleatorios derivados de cebada (EBmac623.1 y K00212). Nótese que la intensidad de señal generada por los híbridos *CBCVd-DIG:CBCVd-ADNc* y *CVd-VI-DIG:CVd-VI-ADNc* es más de 3 veces el valor de intensidad de los genomas ADNc que presentan alguna hibridación inespecífica.

Los resultados presentados en la **Tabla 2** revelaron que los genomas ADNc *CEVd* y *HSVd* presentan zonas que se alinean con el viroide *CBCVd* manteniendo una cobertura de 35% - 49% con una similitud superior al 90%. Por otro lado los genomas *CBLVd*, *CDVd* y *CVd-VI* presentan pequeñas zonas de alineamiento con *CBCVd* a lo largo de toda su secuencia con un porcentaje de bases apareadas de 16% - 28%. El genoma completo de *CVd-VI* se alinea en dos grandes regiones con *CDVd*, presentando una cobertura del 81% pero con una similitud porcentual en estas anotaciones de un 89%. Los genomas *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd* y *CBCVd* tienen varias zonas de alineamiento discontinuas con *CVd-VI* distribuidas en todo su genoma, registrando un 33% - 57% de cobertura con un rango entre 80%-96% de similitud en estas anotaciones (**ver Anexo 1**). Lo anterior explica los resultados obtenidos en la **figura 10** e indica que, a pesar de que se observan leves señales para las secuencias ADNc de algunos de los viroides cítricos testados frente a las sondas *CBCVd* y *CVd-VI*, estas señales son producto de apareamientos discontinuos a lo largo de todo el genoma de la secuencia problema, lo cual no sucede cuando las sondas ADNc son enfrentadas a ARN conteniendo el genoma de algunos de estos viroides, como se revela más adelante.

Tabla 2. Análisis de similitud entre genomas ADNc viroides mediante ensayos *in silico* con alineamiento Blastn *2sequences*. Determinación de los posibles apareamientos de las sondas CBCVd-DIG y CVd-VI-DIG con los genomas ADNc completos de todos los viroides cítricos. Se utilizó el algoritmo *blastn* ajustado en una longitud de 7pb para el punto de origen del alineamiento.

Genoma/Accesión (secuencia problema)	Tamaño	Num. anotaciones / pb con sonda CBCVd-DIG ^a	Num. anotaciones / pb con sonda CVd- VI-DIG ^a	Cobertura en la secuencia ^b (CBCVd/CVd-VI)	Promedio de identidad ^c (CBCVd/CVd-VI)
CEVd (EU872276)	371pb	1 / 85pb 10 / 10pb	1 / 31pb, 6 / 13 pb 18 / 8 pb	35% / 52%	96% / 96%
CBLVd (AB054636)	328pb	9 / 7pb	2 / 56pb, 3 / 18pb 15 / 8pb	16% / 57%	100% / 80%
HSVd (EU872277)	301pb	1 / 32pb, 5 / 20pb 8 / 9pb	2 / 20pb, 4 / 12pb 17 / 8pb	49% / 57%	90% / 92%
CDVd (EU934031)	297pb	2 / 14pb 12 / 7pb	2 / 103pb, 1 / 34pb 10 / 9pb	26% / 81%	96% / 89%
CVd-VI (AB054602)	329pb	4 / 12pb 10 / 7pb	1/ 329pb	28% / 100%	96% / 100%
CBCVd (AB054635)	286pb	1 / 286pb	3 / 13pb, 11 / 7pb	100% / 33%	100% / 96%
ISSR EBmac 623 ^d (sd)	154pb	sd	sd	sd	sd
ISSR K00 212 ^d (sd)	380pb	sd	sd	sd	sd

^a Es el número de anotaciones discontinuas y distribuidas a lo largo de la secuencia problema (*query*), mostrando el promedio de los pares de bases (pb) de los fragmentos que se alinean con la secuencia del genoma total de *CBCVd* o *CVd-VI* (*subject*).

^b Es el porcentaje de bases apareadas (cobertura) que presenta la secuencia problema (*query*) al alinearse con la secuencia del genoma total de *CBCVd* o *CVd-VI* (*subject*).

^c Es el promedio de la similitud porcentual que presentan todas las anotaciones generadas por BLASTn en la secuencia problema al alinearse con la secuencia del genoma total de *CBCVd* o *CVd-VI*.

^d Fragmentos PCR utilizados como control de *background* (Fig 10A y 10B).

Sensibilidad del diagnóstico viroide específico con tejido cidro Etrog infectado.

Las hibridaciones Northern blot para el diagnóstico específico de los viroides *CVd-VI* y *CBCVd* fueron desarrolladas. Se ensayaron los parámetros de sensibilidad para *CBCVd* mediante muestras de cidro infectado, a su vez, se realizaron análisis de sensibilidad para *CVd-VI* y *CBCVd* con controles positivos artificiales reconstruidos mediante transcripción *in vitro*. En la **Figura 11** se expusieron los resultados de sensibilidad obtenidos para una muestra de tejido infectado con *CBCVd*. El ARN fue extraído y depositado en cada pocillo de forma decreciente incluyendo, desde los 20µL hasta los 5x10⁻⁷µL de ARN (equivalente a 333mg hasta 0.12mg de tejido infectado). Las señales obtenidas por hibridación con sonda CBCVd-DIG mostraron un límite de detección de la sonda en esta técnica de 2mg a 4mg de tejido infectado (0.125µL=

230ng a 0.25 μ L= 115ng de ARN), para nuestras condiciones de análisis. Por otro lado, el ARN de cidro sano (333 mg de tejido o 18960 ng de ARN) no presentó ninguna señal positiva ni ruido de fondo en la placa radiográfica.

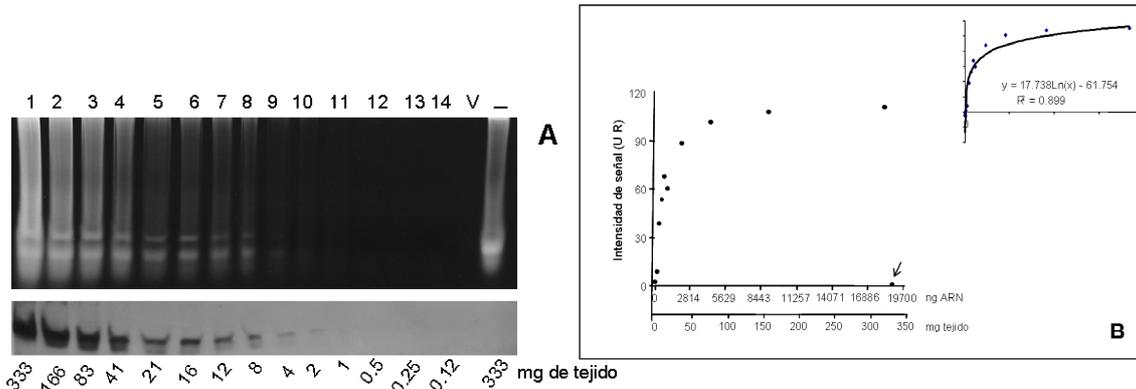


Fig.11. Análisis de sensibilidad Northern blot para muestra cidro Ectoparasitoid infectada con *CBCVd*. **A.** Electroforesis PAGE 5%, electrotransferencia e hibridación con sonda CBCVd-DIG. Carril 1 al 14 siembra de ARN en cantidades decrecientes correspondientes a 18380, 9190, 4595, 2297, 1148, 919, 689, 459, 230, 115, 55, 28, 14, 7 ng de ARN del floema, carril (-), cidro Ectoparasitoid sano (18960 ng de ARN del floema), carril (V), vacío. **B.** Gráfica de dispersión y análisis de regresión de valores de intensidad de señal frente a nanogramos de ARN o miligramos de tejido de los resultados obtenidos de la hibridación Northern Blot del ensayo de sensibilidad de la figura 11.A. Nótese que el punto que hace referencia a 0 UR (18960 ng o 333 mg) es el control negativo del ensayo (indicado con una flecha).

Las intensidades de la señal expresadas en Unidades Relativas mostraron que los valores superiores a 0 UR son tomados como detectables (mediciones según el parámetro de corrección de *background*: control negativo del ensayo = 0 UR). Estos valores de intensidad se encontraron en el rango de 2 UR a 110 UR, definiendo el límite de detección como la menor cantidad en miligramos de tejido que presentan una señal detectable (2mg a 4mg = 2 UR a 8UR). La representación gráfica de los niveles de saturación de las señales generadas por autoradiografía de las diferentes concentraciones de ARN se presentó en la **Figura 11.B** mediante un análisis de regresión y una gráfica de dispersión, mostrando una tendencia positiva explicada por el modelo logarítmico y ajustado con un índice de correlación de $R^2 = 0.899$. Lo anterior indica que, los valores de intensidad de señal que se mantienen en el rango del ARN analizado (o tejido procesado) están asociados de manera logarítmica con la cantidad de ARN *target* presente en la muestra hasta no alcanzar el nivel de saturación que corresponde aproximadamente a 83mg de tejido.

Sensibilidad del diagnóstico viroide específico con transcriptos sintetizados del genoma completo de CVd-VI y CBCVd

Debido a la no disponibilidad de controles positivos de tejido infectado con *CVd-VI*, se resolvió sintetizar y reconstruir controles positivos artificiales (transcriptos monoméricos polaridad positiva) partiendo de plásmidos con el inserto ADNc del genoma completo de *CVd-VI* y por otro lado, del genoma de *CBCVd* para homogeneizar los análisis. Este material sintético no infeccioso (hebras monoméricas de ARNcopia) de los viroides *CVd-VI* y *CBCVd* se utilizaron para ejecutar ensayos de sensibilidad y especificidad de la técnica Northern blot con sondas marcadas en frío y en las condiciones anteriormente descritas. Los plásmidos linearizados y purificados con el inserto del genoma completo de *CBCVd* y *CVd-VI* mostraron una banda de movilidad electroforética entre 4.2Kb (pCR2.1 + inserto). Por otro lado, los transcriptos sintetizados con *T7* ARN polimerasa presentaron una movilidad electroforética aproximada de 500pb en polímeros orgánicos (promotor T7-inserto-zona de restricción) (dato no mostrado). Los productos de la transcripción se cuantificaron por espectrofotometría UV, obteniéndose valores de 73.84ng/μL para *CBCVd* y 86.71ng/μL para *CVd-VI*.

La **Figura 12** reveló la movilidad electroforética y las señales de hibridación de los controles positivos reconstruidos (ARNc viroide monomérico (+) / ARN planta sana = “*spike controls*” o “*spiked samples*”). Los resultados reflejaron que para las concentraciones de ARNc *CVd-VI* de 8671pg, 2890pg, 963pg y 321pg inclusive, se observaron señales evidentes con una intensidad de señal entre 19 UR y 117 UR (control negativo del ensayo = 0 UR). Sin embargo, para la muestra enriquecida (con ARNc viroide) conteniendo 107pg, la señal observable es mínima (-4.3 UR). Por otro lado, no se revelaron señales procedentes de las concentraciones de 35pg y 11pg (**Fig.12.A**). Las muestras enriquecidas o “*spiked*” con transcriptos monoméricos ARNc *CBCVd* de la **Figura 12.B** con concentraciones de 7384ng, 2461ng y 820ng mostraron señales Northern blot distinguibles (40 UR a 115 UR). Sin embargo, la muestra de 273pg genera una leve señal (16 UR). Por otro lado, los ARNs enriquecidos con concentraciones de 91pg, 30pg y 10pg no muestran ningún nivel de saturación de la placa. El límite de detección de las sondas *CBCVd* y *CVd-VI* para esta técnica molecular, con concentraciones en picogramos de transcriptos monoméricos en nuestras condiciones, presentó valores de 273pg y 321pg. La representación gráfica del

ensamblaje de los niveles de saturación de las señales producidas por autoradiografía de las figuras 12.A y 12.B de las diferentes concentraciones de ARNc *CVd-VI* y *CBCVd*, se presentó en la **Figura 12.C** mediante un análisis de regresión y una gráfica de dispersión, mostrando una tendencia positiva explicada por el modelo logarítmico y ajustado con un índice de correlación de $R^2 = 0.8999$. Lo anterior, evidencia que los valores de intensidad de señal comprendidos en el rango de cantidad de ARNc “spike” analizado (expresado en picogramos) están asociados mediante un modelo logarítmico con la cantidad de ARN *target* presente en la muestra hasta no alcanzar el nivel de saturación que corresponde aproximadamente a 963pg de ARNc.

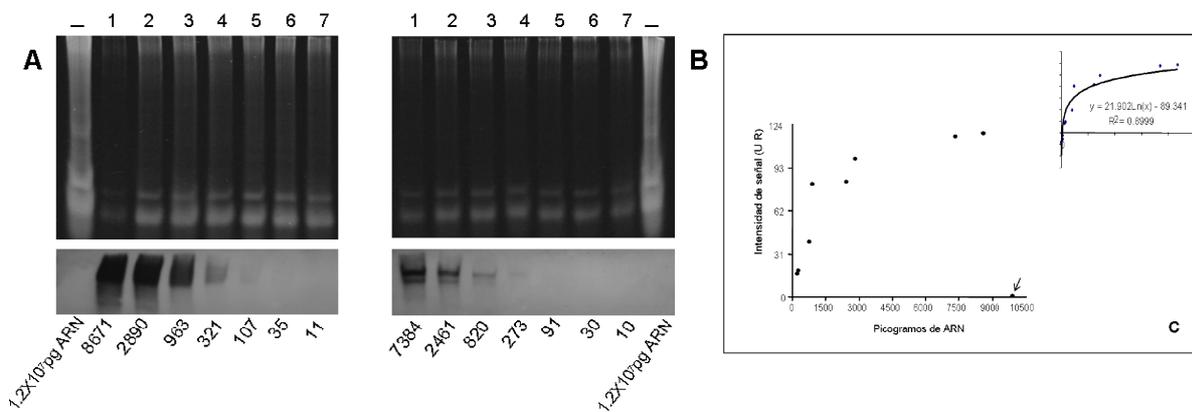


Fig.12. Análisis de sensibilidad Northern Blot de muestras control positivo de *CBCVd* y *CVd-VI* reconstruidas mediante transcripción in vitro y combinadas con ARN de muestras sanas. Electroforesis PAGE 5%, electrotransferencia e hibridación con sonda *CVd-VI-DIG* (A) y *CBCVd-DIG* (B). **A.** Carril 1 al 7 siembra de 1.8ug de ARN de material vegetal sano enriquecido con transcripto monomérico *CVd-VI* en concentraciones decrecientes en picogramos correspondientes a 8671, 2890, 963, 321, 107, 35, 11, carril (-), cidre sano (1.2×10^7 pg de ARN). **B.** Carril 1 al 7 siembra de 1.8ug de ARN de material vegetal sano enriquecido con transcripto monomérico *CBCVd* en concentraciones decrecientes en picogramos correspondientes a 7384, 2461, 820, 273, 91, 30, 10. Carril (-), cidre sano (1.2×10^7 pg de ARN). **C.** Gráfica de dispersión y análisis de regresión de valores de intensidad de señal frente a picogramos de transcripto de los resultados obtenidos en las hibridaciones Northern Blot de los ensayos de sensibilidad de la figura 12 A y B. Nótese que el punto que hace referencia a 0 UR ($>1 \times 10^4$ picogramos de ARN) es el control negativo del ensayo (indicado con una flecha).

Especificidad de las sondas CBCVd y CVd-VI frente a muestras obtenidas a campo.

Muestras de plantas obtenidas a campo de diferentes variedades y zonas cítricas, infectadas con diferentes combinaciones de viroides no presentaron apareamientos frente a las sondas *CBCVd* y *CVd-VI*, como se observó en la **Figura 13**. Las muestras de tejido de cidro infectado con los viroides *CBLVd*, *HSVd:CDVd* y *CEVd* (carriles 1 al 3 respectivamente) no exhibieron señales para ninguna de las sondas hibridadas en las membranas A y B. Por otro lado, el ARN de tejido de ramas obtenidas a campo, no evidencia señales positivas para cada una de las sondas aplicadas en membranas independientes (*CBCVd-DIG*, carriles 4 al 13, **Fig.13.A** y *CVd-VI-DIG*

carriles 4 al 13, **Fig.13.B**). Los controles positivos para este ensayo (cidro infectado con *CBCVd* y ARN de planta sana enriquecido con ARNc(+) de *CVd-VI*) presentaron señales significativas con una intensidad de señal de 140 UR y 142 UR respectivamente, frente a las intensidades de los controles de planta sana (carril 13 en A y B, 30 UR y 22 UR respectivamente). Lo anterior demuestra una elevada especificidad de las sondas *CBCVd* y *CVd-VI* al reaccionar únicamente con los controles positivos disponibles y no producir reacciones de hibridación inespecífica con muestras de tejido que portan diferentes especies de viroides cítricos. La repetibilidad observada en cuanto a la producción de una señal para los controles positivos de *CBCVd* y *CVd-VI* utilizados en los ensayos de hibridación fue del 100%. Es decir, de 14 membranas hibridadas y reveladas en diferentes días, las cuales mantenían controles positivos para *CBCVd* o *CVd-VI*, se observó que las 14 membranas mostraron señales positivas para sus respectivos controles.

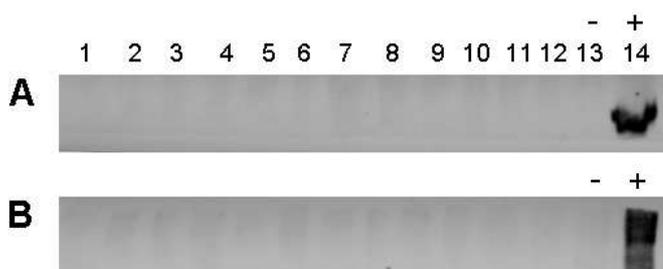


Fig.13. Ensayo de especificidad Northern Blot con sondas marcadas *CBCVd*-DIG y *CVd-VI*-DIG frente a diferentes muestras de plantas a campo. **A.** Carril 1, cidro infectado con *CBLVd*, carril 2, cidro 161 infectado con *HSVd* y *CDVd*, carril 3, cidro CEVd17 infectado con *CEVd*, carril 4, naranjo Washington Navel PEWN02, carril 5, limón K395, carril 6, *Poncirus trifoliata* ISGA, carril 7, *C. volkameriana* ISGvc, carril 8, naranjo Valencia GS171, carril 9, mandarina Satsuma DSzsat002, carril 10, mandarina común FB413, carril 11, pomelo Mol066, carril 12, kumquat CDLKq2, carril 13, pomelo CDL070 (sano), carril 14, cidro 804 infectado con *CBCVd*. **B.** carriles del 1 al 13 (igual que en A), carril 14, transcrito monomérico control *spike* de *CVd-VI*.

Relevamiento de plantaciones cítricas en Uruguay para diagnóstico molecular de *CBCVd* y *CVd-VI*.

Se ejecutó un muestreo exploratorio de diferentes variedades cítricas en zonas de relevancia nacional. Con el criterio de ocurrencia de eventos de infección múltiple en plantas con crecimiento a campo. La colecta fue dirigida en su mayoría hacia árboles que presentaban alguna posible sintomatología de tipo viroide. El muestreo se realizó en el mes de febrero (verano, temperatura media 25°C) para los ejemplares de Canelones; en el mes de mayo (otoño con temperatura media de 17°C) se colectaron las muestras de los departamentos de Montevideo, San José, Río Negro y Salto. Por último, en el mes de setiembre (invierno, con temperatura media de 12°C) se muestreó la zona de Colonia

(Fig.14). Se relevaron 6 departamentos que varían en el grado de importancia en el rubro cítrico nacional, de éstas zonas, se contabilizaron un total de 84 muestras de diferentes especies cítricas para diagnosticar presencia o ausencia de *CBCVd* y *CVd-VI* (Tabla 3 y Anexo 2). Esta prospección de material vegetal asegura una muestra representativa de plantas a nivel nacional basado en los departamentos de importancia cítrica y la cantidad de muestras colectadas entre el Norte y Sur de Uruguay.

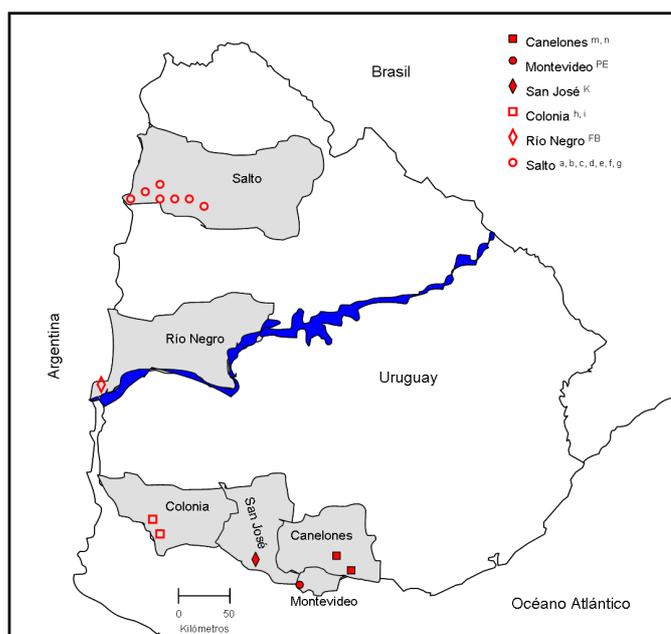


Fig.14. Relevamiento de plantas a campo de diferentes zonas cítricas de Uruguay. Se muestran sombreados únicamente los departamentos de colecta. Las letras en superíndice indican puntualmente la zona de recolección. ^m Canelones Este y Pando, ^{PE} Punta Espinillo, ^K Kiyú, ^{h, i} San Pedro y La Arenisca, ^{FB} Fray Bentos, ^{a, b, c, d, e, f, g} Estación Experimental INIA Salto Grande, Estación Experimental San Antonio, Fac.Agronomía, Zona 1, Zona 2, Zona 3, Zona 4, Zona 5 respectivamente.

Tabla 3. Colecta de material vegetal de diferentes zonas cítricas de importancia nacional para diagnóstico molecular de *CBCVd* y *CVd-VI*. Cantidad de muestras de campo para cada tipo de variedad recolectada, tipo de variedad (especie) a la que pertenece y zona aproximada de colecta (ver códigos en anexo 2).

Cantidad de muestras	Tipo de variedad (especie)	Zonas del relevamiento
4	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)	Canelones ⁿ
1	Pomelo Duncan (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)	Canelones ^m
2	Pomelo Star ruby (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)	Colonia ⁱ
16	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.)	Canelones ^m , Montevideo ^{PE} , San José ^K , Salto ^{b, e, f, g}
9	Naranja Valencia Late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb.)	Canelones ^m , Colonia ⁱ , Salto ^{c, e}
8	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)	Canelones ^m , Salto ^{b, c, e}
3	Mandarina Murcott (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)	Canelones ^m , Salto ^{b, d}
13	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)	Colonia ^h , Salto ^{b, f} , Río Negro ^{FB}
2	Mandarina Ellendale (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)	Salto ^g
17	Limón Lisbon (<i>C. limon</i> (L.) Burm.)	Canelones ^m , Montevideo ^{PE} , San José ^K , Colonia ^{h, i} , Río Negro ^{FB}
2	Kumquat (<i>Fortunella</i> sp.)	Montevideo ^{PE} , Colonia ⁱ
3	<i>Poncirus trifoliata</i>	Salto ^{a, d}
2	<i>Citrus volkameriana</i>	Salto ^a
2	Cidro Etrog (<i>C. medica</i>)	Canelones

^a Estación Experimental INIA Salto Grande. ^b Estación Experimental San Antonio, Fac. Agronomía. ^c Zona 1, ^d Zona 2, ^e Zona 3, ^f Zona 4, ^g Zona 5. ^h San Pedro, ⁱ La Arenisca. ^m Este, ⁿ Pando. ^K Kiyú. ^{PE} Punta Espinillo, ^{FB} Fray Bentos.

Diagnóstico Molecular de *CBCVd* y *CVd-VI* en material vegetal a campo de zonas cítrícolas de importancia nacional.

Las 84 muestras de ARN, obtenidas por extracción EVC de corteza de diferentes cultivares y especies cítricas de 6 localidades del país, fueron diagnosticadas mediante hibridaciones Northern blot. Las cuales no mostraron señales positivas frente a cada una de las sondas no radioactivas *CBCVd*-DIG y *CVd-VI*-DIG. Estos resultados son reflejados en la **Figura 15**, mostrando la tendencia de los posteriores testajes ejecutados sobre la totalidad de las plantas colectadas.

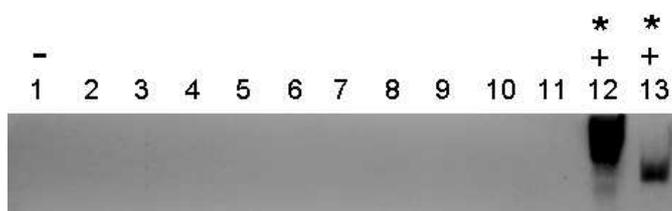


Fig.15. Diagnóstico molecular de rutina mediante hibridación Northern blot con un cóctel de sondas de *CBCVd* y *CVd-VI* frente a diferentes muestras de plantas a campo. Carril 1, cidro Etrog sano, carril 2, pomelo G030, carril 3, pomelo G052, carril 4, mandarina común FB412, carril 5, mandarina común FB412, carril 6, mandarina común FB413, carril 7, Washington Navel PEWN01, carril 8, Washington Navel KWN05, carril 9, naranjo Valencia GS170, carril 10, naranjo Valencia Mol167, carril 11, pomelo Mol066, carril 12, transcripto monomérico control *spike* de *CVd-VI*, carril 13, cidro Etrog infectado con *CBCVd*. * , $P < 0.001$ comparado con las intensidades de señal de todos los resultados negativos de las 84 muestras testadas.

Los resultados generales reflejan que las muestras de distintas especies/variedades de plantas cítricas de la totalidad de zonas colectadas, no presentaron reacciones de hibridación frente a membranas independientes ensayadas con las sondas *CBCVd* o *CVd-VI* ni mediante un cóctel de las mismas. De manera similar ocurrió con el tejido sano analizado como control. Por otro lado, los controles positivos para los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* presentan, en promedio, fuertes señales de saturación entre los 146 UR a 97 UR con las concentraciones y cantidades ya antes definidas. Estos resultados se soportaron mediante una prueba *t*, la cual reveló que las intensidades de señal de los controles positivos de todos los ensayos Northern blot con las sondas *CBCVd* y *CVd-VI* son significativamente diferentes a las intensidades de señal de todos los resultados negativos de las 84 muestras testadas ($P < 0.001$). Los resultados de las 84 muestras de campo relevadas y analizadas se mantuvieron constantes en cuanto a la no aparición de señales positivas con las sondas no isotópicas elaboradas en este estudio, reflejando la ausencia de *CBCVd* y *CVd-VI* en los materiales

diagnosticados por Northern blot, de las zonas relevadas y en nuestras condiciones de análisis.

Discusión.

Capítulo 1. Evaluación de métodos de extracción de ARN viroide en referencia a herramientas moleculares de diagnóstico disponibles y caracterización de la técnica Northern blot en cuanto a sensibilidad y eficiencia diagnóstica en variedades cítricas colectadas a campo.

Mediante ensayos con diferentes técnicas moleculares dirigidas para la detección del genoma completo de viroides en variedades cítricas comerciales y utilizando diversos protocolos de extracción, se logra obtener un método eficiente de extracción de ARNvd. Al ejecutar hibridaciones moleculares Northern blot con sondas no radioactivas utilizando como modelo al *CEVd* se obtienen resultados diagnósticos confiables para este método. Por otro lado, la herramienta de detección viroide Northern blot seleccionada por su buena respuesta diagnóstica junto con la extracción viroide convencional, muestra una alta sensibilidad y eficiencia cuando se ejecuta con sondas de los modelos patógenos *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd* y *CDVd*. En esta sección discutiremos la evaluación y selección de una extracción de ARN viroide como punto de partida para un diagnóstico molecular efectivo, las herramientas moleculares disponibles, empleadas y acopladas con la recuperación de ARNvd, el desempeño de estas técnicas de detección y la caracterización de la aproximación diagnóstica Northern blot en cuanto a sensibilidad y eficiencia.

Rendimiento de la extracción de viroides: cuantificación y pureza.

Las extracciones de ARNvd se fundamentan en la recuperación de fracciones de bajo peso molecular del ARN total de la muestra. En ésta fracción se obtienen las copias viroides necesarias para el diagnóstico. Las muestras sujetas a extracción provienen de tejido específico de la planta, esto para asegurar la óptima recuperación del ARN de origen viroidal. A partir de material vegetal de campo, se observa un buen rendimiento en el título de ARN del patógeno al realizar extracciones del tejido por donde transita el

viroide (floema). En este sentido, resultados similares en cidro Etrog son los expuestos por Li *et al.* (1995), los cuales indican que en corteza la concentración del viroide *CEVd* es 10 veces mayor que en hojas de esta misma variedad. Sin embargo, el tejido foliar proporciona un elevado título de viroides por las características bioamplificadoras del genoma patógeno que posee este hospedero sensitivo. La utilización de diversos métodos de extracción para la recuperación de viroides en material vegetal y la aplicación de técnicas moleculares para su diagnóstico son ejecutadas con la finalidad de simplificar el proceso de detección, sin perder la sensibilidad, confiabilidad y eficiencia (Bernad y Duran-Vila, 2006; Elleuch *et al.*, 2003; Ragozzino *et al.*, 2004; Nakahara *et al.*, 1998b). Las extracciones SAP, FTG, EVC, FS se basan en protocolos y reactivos bastante disímiles, excepto que las últimas tres aprovechan la rigurosidad del fenol en cuanto a la ruptura de membranas celulares y la remoción puntual de proteínas en la fase oleosa. De esta manera, las concentraciones de ARN derivadas en las extracciones EVC y FS son comparables en cuanto a la obtención de nanogramos de ARN por cada mililitro de resuspendido. Sin embargo, la pureza obtenida para FS decae de manera abrupta comparada con el valor óptimo de 1,9 (coeficiente 260/280nm) que presenta la extracción EVC, posiblemente por la serie de pasos diferenciales y de purificación que presenta ésta última, además, por la ausencia de homogenización y ruptura mecánica con aparatos que podrían introducir contaminaciones en la extracción. El ARN recuperado de la extracción SAP muestra los valores más bajos en concentración y a su vez, una pureza deficiente. Posiblemente por la precipitación diferencial con polietilenglicol (PEG) generando pérdidas en la recuperación del ARN del floema. Por otro lado, la ausencia de pasos que capturen o discriminen los contaminantes celulares liberados en la pulverización del material con N₂ líquido, podrían estar relacionado a los niveles de pureza. La concentración obtenida para la metodología FTG es significativamente mayor que el resto de las extracciones ensayadas. Esta situación se explica por la ausencia de pasos diferenciales para recuperar ARN de bajo peso molecular, siendo cuantificada la totalidad del ARN del hospedero. El nivel óptimo de pureza reportado para ésta técnica, se relaciona posiblemente con las cualidades de los reactivos en la separación absoluta de fases y la inactivación de nucleasas endógenas manteniendo la integridad del ARN. En general, los niveles de pureza y concentración obtenidos por los métodos EVC / FTG, por un lado, y SAP / FS por otro, se ven reflejados en los resultados que arrojan las

evaluaciones de estos métodos con las herramientas moleculares de detección empleadas.

Efecto del método de extracción de ARN en las técnicas RT-PCR, Northern blot y Dot blot.

Los resultados obtenidos en las transcripciones reversas de las diferentes extracciones de material vegetal a campo son generalmente consistentes en cuanto a los tipos de extracción reportados y empleados por Bernard y Duran-Vila (2006), las cuales permiten sintetizar el ADNc viroide o en algunos casos provocar inhibición. Lo anterior, hace referencia en este trabajo a los amplicones obtenidos por los métodos EVC / FTG y la posible inhibición enzimática generada con FS / SAP. Sin embargo, Bernard y Duran-Vila (2006) indica que las extracciones SAP sin modificaciones son idóneas para el desarrollo de RT-PCR para la detección viroide, siendo este resultado contrario a los obtenidos en este estudio. Lo anterior podría deberse a las diferencias en nuestro protocolo de extracción, las condiciones de reacción aplicadas, los cebadores y enzimas utilizadas. Por otro lado, no se reportan amplificaciones inespecíficas en el ensayo presentado en la figura 1.A y 1.A' cuando el material vegetal de origen es una variedad de *Citrus limon*. Sin embargo, para otras variedades cítricas, las bandas RT-PCR inespecíficas son recurrentes, debido a la irregularidad de la técnica en la síntesis de la primera hebra y la posterior amplificación. Es frecuente que al ejecutarse ensayos de transcripción reversa en diferentes variedades cítricas y con bajas temperaturas de retrotranscripción, ocurran anomalías en los resultados esperados, como por ejemplo la obtención de falsos negativos provocados por inhibidores de la reacción (polisacáridos y polifenoles) (Bernard y Duran-Vila, 2006; Wang *et al.*, 2008) o el plegamiento de la estructura secundaria viroide en formas de difícil acceso al bajar la temperatura en la retrotranscripción, induciendo situaciones de no complementariedad o restricciones en la unión enzimática (Navarro *et al.*, 1998). Es posible la visualización de amplificaciones no específicas de alto y bajo peso molecular en las RT-PCR por causa de copias repetidas en *tandem* o debido a la transcriptasa reversa que interactúa en templados circulares. La aparición de amplificaciones inespecíficas podría comprometer la confiabilidad de los resultados (con fines diagnósticos), provocando una posible interpretación errática de la presencia o ausencia de viroides en una muestra determinada.

Las hibridaciones Dot blot revelan la capacidad de esta herramienta en detectar hebras complementarias a la sonda dsADN-DIG aplicada en extracciones basadas en el método EVC (**Fig.1.C**) y sin la interferencia de moléculas que reaccionen con ellas provocando falsos positivos (control cidro sano). Sin embargo, en ensayos Dot blot en condiciones de diversa rigurosidad y sin la presencia de agentes desnaturizantes o reactivos que desdoblén los complejos ribonucleoproteicos, se podrían obtener falsos positivos o resultados visuales que confundan el diagnóstico (Ito *et al.*, 2002a; Cañizares *et al.*, 1999). Observaciones en este sentido y expuestas por WenXing *et al.* (2009) revelan la posibilidad de interacciones entre sondas ADN viroides con complejos ribonucleoproteicos del hospedero, provocando señales erráticas en hibridaciones moleculares Dot blot. Además, posibles complejos ARN-proteína *in vivo* formados entre *HSVd* y lectina *floem protein 2* (proteína más abundante del floema) con funciones de movilidad viroide en largas distancias dentro de la planta, fueron expuestos por Gómez y Pallás (2004). Estas proteínas podrían provocar una interferencia o unión de las sondas en muestras no infectadas resueltas mediante hibridaciones ARN Dot-blot. Por otro lado, los viroides podrían sufrir modificaciones en la geometría molecular de sus motivos estructurales y potenciar interacciones con proteínas de la planta (Rodio *et al.*, 2006).

La técnica molecular Northern blot comprueba la capacidad diagnóstica de este tipo de hibridación aplicada a ARN obtenido por diferentes caminos metodológicos. Se observan señales con elevada intensidad únicamente en la extracción EVC, lo que deja de manifiesto que la sonda CEVd-DIG se aparee con un elevado título del viroide hasta un punto de saturación (**Fig. 1.B' y 1.D**). Por otro lado, queda en evidencia la menor sensibilidad que poseen las hibridaciones moleculares en comparación con la RT-PCR, ya que la extracción FTG no produce señales compactas en la autorradiografía y si revela la presencia viroide en la RT-PCR. Sin embargo, la confiabilidad de las transcripciones reversas para fines diagnósticos es afectada por los resultados erráticos y recurrentes obtenidos con otras variedades cítricas. La extracción EVC acoplada con la herramienta molecular Northern blot es reportada por Murcia *et al.* (2009) como una técnica diagnóstica confiable y robusta para la detección de viroides en material de campo, siendo estos resultados comparables a los obtenidos en este apartado. Sin embargo, ensayos de sensibilidad y eficiencia son discutidos a continuación para

demostrar la capacidad diagnóstica del complejo EVC-Northern blot en nuestras condiciones.

Sensibilidad y eficiencia del método Northern blot en la detección individual o de mezclas de viroides en tejido infectado

La observación de señales desde el volumen óptimo de aplicación de la técnica hasta el menor volumen utilizado que presente una señal visualmente evidente, demuestra una sensibilidad aceptable para el diagnóstico de viroides por esta herramienta y en las condiciones puntuales de este ensayo. Relacionado a lo anterior, se debe tomar en cuenta que el material utilizado procede de condiciones naturales y no tuvo un pasaje por un bioamplificador. Nuestras observaciones en este apartado, para modelos viroides cítricos que no incluyen a *CBCVd* y *CVd-VI*, revelan deducciones diagnósticas confiables. Estas deducciones son soportadas mediante graficas de dispersión y análisis de regresión que ubican el punto límite de detección como el volumen mínimo utilizado que desarrolla una señal de presencia viroide en la muestra, comparado con el volumen e intensidad de señal producido por el control sano (**Fig.2**) (Pagliano *et al.*, 2010a). Estos resultados son similares a los reportados por Murcia *et al.*, (2009) y Mohamed *et al.*, (2009). La eficiencia del ensayo Northern blot utilizando la extracción EVC es reforzada mediante las señales obtenidas de diferentes variedades cítricas en membranas independientes, aplicando una sonda exclusiva. La obtención de señales con diferentes niveles de saturación indican las posibles fluctuaciones en cuanto al título de viroide que permanece en materiales recuperados de cultivares cítricos (**Fig.3**) (Pagliano *et al.*, 2010a). Sin embargo los ensayos de sensibilidad demuestran que con una mínima cantidad de tejido se consigue un diagnóstico fiable y que material infectado con baja concentración del patógeno no sería capaz de escapar al diagnóstico molecular. Por otro lado, la regularidad en la obtención de resultados de presencia/ausencia para diversos cultivares no se ve afectada por la variedad cítrica comercial diagnosticada, como si ocurre en el caso de la RT-PCR ejecutada en nuestros ensayos. El punto de corte o parámetro de inclusión de una muestra dentro de un resultado de ausencia o presencia del patógeno, se logró definir. Así que, dos veces la mayor intensidad de señal que presenta el control negativo en el ensayo, determina el *cut-off* como parámetro de ausencia/presencia de viroides en un tejido vegetal recuperado de campo (**Fig.4**) (Pagliano *et al.*, 2010a). Esta determinación se corresponde perfectamente con las observaciones visuales de las señales en la placa

radiográfica, acomplejando éstas últimas con los resultados cuantitativos de intensidades de señal, lo que prueba la capacidad diagnóstica de la asociación Northern blot-EVC implementada en nuestras condiciones.

Capítulo 2. Herramientas moleculares PCR y transcripción reversa para la síntesis y verificación de secuencias completas del genoma de *CBCVd* y *CVd-VI*.

El ajuste de la reacción de amplificación por PCR de plásmidos recombinantes, que conservan el inserto del genoma completo de *CBCVd* y *CVd-VI*, es satisfactorio. De esta manera, el posterior ajuste de las RT-PCR ejecutadas en plantas indicadoras muestra niveles aceptables de recuperación viroide para fines de clonación y secuenciamiento. Sin embargo, el desarrollo óptimo de transcripciones reversas para soluciones diagnósticas no es completo y eventualmente errático o confuso, detalles que se discuten en este capítulo.

Ajuste de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y RT-PCR

Son obtenidos los controles positivos para el desarrollo de los procesos de ajuste de la PCR para los viroides en estudio, demostrando identidad con las secuencias reportadas. El volumen generado de vectores recombinantes con insertos viroides mediante transformación, facilita la manipulación y la disponibilidad de material artificial sin capacidades infectivas, determinado a su vez, el comienzo de un ajuste metodológico básico para la obtención de copias en número de las secuencias de ADNc de *CBCVd* y *CVd-VI*. Por otro lado, la temperatura de apareamiento de los cebadores en las reacciones de amplificación ejecutadas es alta, provocando un descenso de la intensidad de las bandas debido a una disminución en el número de copias sintetizadas (**Fig.5A** y **6A**). Este efecto es observable cuando la temperatura de hibridación es elevada, por otro lado la especificidad incrementa y los productos inespecíficos son infrecuentes (Henegariu *et al.*, 1997). Esta determinación metodológica en cuanto a la selección de una elevada temperatura de reacción se basa en la posibilidad de hibridaciones inespecíficas del cebador debido a la similitud de secuencia que comparten algunos viroides cítricos. La estabilidad de los cebadores para las reacciones PCR de genomas viroides ADNc depende de la cantidad G:C que conforma al

fragmento oligomérico. Sin embargo, las zonas conservadas de la estructura del viroide, en las cuales están dirigidos los cebadores, mantienen una cierta similitud de secuencia entre viroides (lo mismo ocurre entre todos los genomas de viroides cítricos y sus zonas estructurales). Por lo tanto, la astringencia de la reacción para los casos de *CBCVd* y *CVd-VI*, en cuanto a la temperatura, debe ser elevada, tanto así, que el óptimo es cercano al punto de inestabilidad térmica (T_m) de los cebadores. En este mismo sentido, podrían ocurrir apareamientos imperfectos del cebador complementario en la transcripción reversa, debido a la rápida renaturalización de la molécula del viroide a bajas temperaturas de actividad de la transcriptasa, provocando la hibridación incompleta de un cebador en la molécula ARNvd. Lo que provoca amplificaciones inespecíficas o una síntesis ineficiente de la primera cadena inducida por una reducción de la procesividad de la enzima (Nakahara *et al.*, 1998a; Henegariu *et al.*, 1997). El ajuste intermedio de la técnica RT-PCR puede interferir en el desempeño de los resultados y en la generación de falsos positivos y negativos. Situaciones de inespecificidad en la transcripción reversa son mostradas en ensayos que evidencian fragmentos amplificados menores a 175pb en material infectado con *CEVd* o *HSVd* y tejido sin infección (Yang, *et al.* 1992). Situaciones similares se observan en la producción de bandas con movilidad electroforética visualmente similares a la del genoma de *CBCVd* y *CVd-VI* (**Fig.5** y **6**). Estas reacciones de transcripción no fueron realizadas con transcriptasas que poseen una actividad óptima a elevadas temperaturas (60°C), lo cual evita en el proceso de síntesis un re-apareamiento interno de la molécula del viroide. La utilización de cebadores complementarios para la síntesis del ADNc con contenidos balanceados de G:C y A:T (este estudio) podrían provocar una inestabilidad en el apareamiento o el sitio de unión. Debido a lo anterior, es necesario emplear cebadores complementarios para RT de elaboración exclusiva (longitud incrementada, acoplamiento óptimo y contenido G:C máximo) para el inicio de la primera cadena en la transcripción reversa (Bernard y Duran-Vila, 2006).

Reconocimiento de la identidad de amplificaciones inespecíficas obtenidas por RT-PCR.: posibles uniones entre cebadores y ARNs del hospedero.

Las amplificaciones por RT-PCR de material cidro infectado, que visualmente se asemejan con el genoma completo de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI*, revelan diferencias en el peso molecular esperado y significativas discrepancias a nivel de secuencia

(Fig.5B, C y 6.B), esta situación se comprueba mediante secuenciación de los fragmentos amplificados. La identidad de las secuencias descubre que i) las bandas que se esperan como la representación del genoma total del viroide *CBCVd* mantienen similitud a zonas de ARNs del hospedero (ARNs mensajeros que traducen para proteínas vacuolares e hipotéticas). Por otro lado, ii) amplicones RT-PCR para *CBCVd* y *CVd-VI* poseen identidad con clones ADNc viroides transformados (productos de ADN plásmídico provenientes de transformaciones realizadas en este estudio). El primer caso se podría explicar por el apareamiento inespecífico y discontinuo del cebador complementario en zonas de alta similitud del ARN mensajero del hospedero, provocando la transcripción reversa de una zona en especial de ésta secuencia. Este evento no ocurre con las muestras ARN positivas para *CBCVd*, las cuales presentan un amplicón de movilidad electroforética e identidad de secuencia con este viroide. Esta condición infiere una posible competitividad de los cebadores entre zonas de máxima similitud (ARNvd objetivo) y otras regiones de similitud intermedia (ARNs del hospedero). La unión inespecífica de los cebadores en ARN no viroide (ARN del hospedero) podría mantener una preferencia de unión en estos ácidos nucleicos, de manera más consistente que el ARNvd de otras especies presentes en las muestras de cidro infectado. A pesar de la alta similitud entre viroides cítricos, los cebadores para *CBCVd* no se hibridizan con especies viroides localizadas en las muestras cidro analizadas. Estudios sobre la alteración de transcriptos (ARNm) en hojas de cidro Etrog infectadas con *CDVd*, revelan que algunos fragmentos de ADNc (segmentos de ARNm) expresados diferencialmente bajo infección viroide se encuentran en el rango de 229-312 pb. Estas secuencias muestran alta homología para proteínas con funciones de defensa frente a patógenos y otras proteínas hipotéticas de función desconocida que son codificadas por estos ARNm diferencialmente expresados (Tessitori *et al.*, 2007). Las proteínas de la familia VPS, las cuales mantienen funciones de tráfico macromolecular y vesicular, están presentes en ARN recuperado del floema de calabaza, junto con RBP (proteínas de unión al ARN) con funciones de tráfico y plegamiento del ARNm (Lin *et al.*, 2009). Lo que podría indicar que dada la permanencia en el floema del ARNm codificante para estas proteínas y las similitudes de secuencia registradas en este estudio, una interacción entre cebadores y ARNs del hospedero podría ser factible. Los posibles acoplamientos erráticos del cebador específico CVIV-CP (+), podrían ocurrir por la similitud parcial, definida por alineamiento múltiple y acoplamiento *in silico* de baja rigurosidad, que presentan los oligómeros iniciadores con la zona de algún ARN

mensajero, provocando que la transcriptasa inicie la síntesis en esta región en condiciones de baja temperatura, pero óptimas (42°C) para la enzima empleada en este ensayo. Diferentes niveles de similitud viroide entre secuencias de diversas zonas codificantes de proteínas hipotéticas de organismos especialmente procariotas y plantas fueron reportados por Trivedi *et al.* (2007) utilizando el algoritmo BLASTn, sin embargo no se encontraron similitudes significativas.

La segunda situación, debida a la identidad de amplicones secuenciados con clones transformados, podría deberse a contaminaciones cruzadas en la reacción RT-PCR. Esta reacción se realiza en dos pasos-2 tubos, lo que incrementa la posibilidad de errores de manipulación e introducción de ADN plasmídico en los tubos de reacción. Los resultados obtenidos en la **Figura 7** (para algunas muestras de cidro Etrog) exhiben artefactos de secuencia desconocida y de tamaño molecular muy diferente al esperado, provocadas posiblemente por los argumentos antes discutidos que involucran los cebadores, la enzima transcriptasa reversa y la estructura secundaria del viroide. Sin embargo, las señales obtenidas por hibridación de los fragmentos derivados por RT-PCR justifican la presencia de las secuencias esperadas de origen viroide (**Fig.8**), validando los amplicones sintetizados. Los resultados erráticos y confusos de las transcripciones reversas, obtenidos en nuestras condiciones, indican que para fines diagnósticos el ajuste de la técnica es sub-óptimo, y a su vez, esta herramienta molecular sería poco favorable para soluciones de detección, pero si de recuperación y clonación de viroides cítricos en material de campo.

Capítulo 3. Caracterización de sondas marcadas DIG-11-dUTP y determinación de parámetros diagnósticos de las especies *CBCVd* y *CVd-VI* para el análisis de rutina en material de campo.

Las sondas no-radioactivas marcadas por PCR son obtenidas y aplicadas para el diagnóstico molecular de *CBCVd* y *CVd-VI*. A su vez, la implementación de una metodología diagnóstica sensible, específica y confiable es efectuada, la cual se basa en hibridaciones moleculares Northern blot con la capacidad de evaluar la presencia/ausencia de los genomas de *CBCVd* y *CVd-VI* en material vegetal a campo. Este material utilizado para el diagnóstico viroide es relevado de diferentes zonas citrícolas de Uruguay, obteniendo una buena diversidad de variedades comerciales, en

diferentes estaciones del año y con una amplia colecta nacional. Los caminos metodológicos para la implementación de la herramienta de hibridación molecular Northern blot en el diagnóstico viroide son discutidos. Por otro lado, la ocurrencia de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* en Uruguay mantiene la tendencia de distribución mundial y regional, situación expuesta en este capítulo.

Sondas moleculares *CBCVd* y *CVd-VI*: eficiencia del marcaje y determinación de las uniones con ADNc de alta similitud de secuencia.

Las sondas *CBCVd* y *CVd-VI* sintetizadas y marcadas con DIG mediante PCR, se comportan clásicamente según su movilidad electroforética. De esta manera, el avance de los ácidos nucleicos es rezagado, debido a el peso molecular incorporado por la molécula digoxigenina-11-uridina-5'-trifosfato intercalada en las hebras de ADN. La intensidad de las bandas correspondientes a las sondas está directamente relacionada con la disminución en el número de copias (en comparación con el control sin marcar) causado por un efecto de retardo en la actividad ADN polimerasa producto de la digoxigenina en la reacción. Las sondas generadas presentan una eficiencia satisfactoria de marcaje, ya que visualmente se evidencian niveles de saturación a muy bajas concentraciones, de manera similar al control comercial de ADN marcado (**Fig.9**). Lo anterior prevé, que en las reacciones de hibridación, la sonda no sea un factor limitante en cuanto a la cinética de acoplamiento entre ARNvd y sonda ADNc-DIG. Esto evita que altos niveles de copias de secuencias complementarias del viroide presente en la muestra ARN estén unidas con hebras homólogas no marcadas de la sonda (Murcia *et al.*, 2009), escenario que acarrea señales de baja intensidad en las hibridaciones moleculares por causa de competencia y apareamientos entre moléculas que no emitirían señales y las que permanecen marcadas. Las sondas dsADN-DIG de *CBCVd* y *CVd-VI*, frente a secuencias ADN doble hebra de alta similitud, responden de manera esperada en la formación de híbridos con alta estabilidad y fuerza de unión. De esta manera, el apareamiento de estas sondas en genomas ADNc viroides no específicos se observa visualmente reflejado mediante señales tenues en ensayos Southern blot para *CBCVd-DIG:CEVd-HSVd* y leves señales en *CVd-VI-DIG: HSVd-CDVd-CBCVd* (**Fig.10A y B**). Sin embargo, las intensidades de señal positivas del ensayo determinadas por los híbridos *CBCVd-DIG:CBCVd-PCR* y *CVd-VI-DIG:CVd-VI-PCR* son significativamente diferentes a las señales inespecíficas de baja intensidad visualizadas, siendo estas últimas, aproximadamente 4 veces menor que la señal

positiva específica (**Fig.10C y D**). Estas hibridaciones entre secuencias ADNc-viroides de distintas especies, se explica por las similitudes de la estructura primaria que mantienen todos estos patógenos cítricos y los sucesos de apareamientos imperfectos entre las hebras homóloga / complementaria de la sonda y el ADNc doble hebra complementario / homólogo. Escenario que permite inferir una posible interrupción del apareamiento de bases en las posiciones en que las dos cadenas no se complementan, provocando la disminuída intensidad de las señales por el reducido número de copias marcadas con digoxigenina que logran permanecer unidas al fragmento PCRvd determinado. Este evento de hibridación cruzada fue reportado por Palacio *et al.* (1999) en hibridaciones moleculares con sondas ADNc-DIG, las cuales mantiene baja afinidad con el ARNvd templado no específico para una sonda determinada, provocando señales suaves o imperceptibles debido a la similitud de secuencias compartidas entre viroides. Esta situación reportada se asemeja a la inespecificidad del acoplamiento entre las sondas ADNc de este estudio con los fragmentos ADNc de otros viroides cítricos, evento que no sucedió cuando los ácidos nucleicos objetivo o *target* provenían de material vegetal. Un análisis *in silico* ejecutado en este trabajo, trata de explicar estos posibles apareamientos imperfectos, demostrando que, en cierto nivel, los genomas ADNc viroides doble hebra presentan similitudes de secuencia sutiles distribuidas discontinuamente en toda la hebra (**Tabla.2**), lo que posiblemente provoque la visualización de las señales inespecíficas en las hibridaciones Southern blot. Cabe destacar, que la concentración de los amplicones PCR electrotransferidos a la membrana para este ensayo, poseen una elevada cantidad de nanogramos de ADN, induciendo una rápida saturación de la placa, efecto complementado a la sensibilidad de la técnica de hibridación molecular. Sin embargo, la especificidad de las sondas viroides frente a ARN de material vegetal no se ve afectada, como se advierte en el capítulo 1 (**Fig.3**) y para sondas específicas *CBCVd* y *CVd-VI* como se discute más adelante.

Estudio de parámetros diagnósticos de las hibridaciones moleculares Northern blot: Sensibilidad y especificidad

Las hibridaciones moleculares Northern blot implementadas y ajustadas en este estudio, son el principio de la cooperación y transferencia de técnicas moleculares de diagnóstico de países con investigación y desarrollo tecnológico que apunta a la producción de material citrícola saneado y libre de patógenos transmisibles por injerto, como los viroides. El ajuste de la herramienta diagnóstica de hibridación molecular

Northern blot aplicada a variedades cítricas relevadas en este trabajo, marca el camino metodológico para el desempeño de una técnica sensible, específica, eficiente y confiable, parámetros que se exponen y discuten en este apartado. La sensibilidad diagnóstica conseguida en nuestros ensayos, se basa en el ensamblaje de una técnica concreta de extracción junto con una serie de pasos distintivos de las hibridaciones Northern blot, pero con características puntuales de ejecución y desempeño. La extracción EVC demuestra la recuperación de ARN de bajo peso molecular, enriquecido con una elevada concentración de ARNvd, con coeficientes de pureza óptimos y en un tiempo moderado de manipulación, como se expuso en el capítulo 1. Esta extracción de ácidos nucleicos es el comienzo de una ruta diagnóstica que se representa con los siguientes pasos puntuales y posiblemente determinantes: i) la resolución del complejo ARNvd:ARN celular mediante movilidad en geles PAGE, del cual se consigue la recuperación de una zona de permanencia viroide según su capacidad de avance en el gel. Esto permite la electrotransferencia puntual de ARN exclusivamente patógeno, acompañado de algunos ARNs pequeños/degradados y ARN ribosomal del huésped. Para estos últimos, no hay reportes de interferencia con las sondas ADNc-DIG, lo cual es soportado mediante nuestros resultados. ii) hibridaciones moleculares con sondas marcadas en frío, las cuales son sometidas a desnaturalización previa y aplicadas junto con una solución de hibridación con componentes de alta fuerza iónica con funciones amortiguadoras y soluciones estabilizadoras del ARN como la formamida (extiende la molécula viroide). Por otro lado, la utilización de agentes de disrupción de complejos ribonucleoproteicos, detergentes y bloqueadores de sitios activos en la membrana. iii) lavados de la membrana con máxima astringencia, en cuanto a niveles de fuerza iónica y temperatura, lo cual previene las uniones inespecíficas entre la hebra homóloga de la sonda y la hebra complementaria del ARN no viroide, disminuyendo los niveles de ruido de fondo. Por otro lado, la estabilidad entre los híbridos ARN:ADN es baja, por lo que necesita alta complementariedad de bases. Sin embargo, cuando se forman los híbridos ARNvd:ADN-DIG las uniones covalentes suelen ser muy fuertes. Los anteriores puntos metodológicos colaboran en la obtención de resultados diagnósticos sensibles, que *a priori*, están determinados por la técnica clásica de hibridación molecular. Sin embargo, este enfoque Northern blot es acompañado por datos satisfactorios obtenidos en cuanto al límite de detección de 2-4mg de tejido de cidro Etrog infectado con *CBCVd* y el reporte de 8mg de tejido para una variedad comercial (capítulo 1). Lo anterior, revela un intervalo de sensibilidad que se ubica entre 8 a 2mg

de tejido fresco, soportando los términos de confiabilidad diagnóstica (**Fig.11**). Resultados similares revelan que la sensibilidad mediante hibridaciones Dot-blot para *CEVd* y *HSVd* de ARN extraído de corteza de cidro y la aplicación de sondas ADNc-DIG es de 2-10mg de tejido (Li *et al.*, 1995). Por otro lado, Noronha Fonseca *et al.* (1996) reporta una sensibilidad de 15-7mg de tejido de cidro Etrog infectado con *CEVd* mediante hibridación molecular Dot blot con sondas ARNc-DIG detectadas por colorimetría. De manera similar, con el uso de sondas ARNc-DIG, hibridaciones tipo Dot-blot ensayadas en hojas de lúpulo infectadas con *HSVd* detectaron este viroide en una extracción basada en 1mg de tejido fresco (Nakahara *et al.*, 1999). Velásquez (2004) reporta una sensibilidad de 0.05ul de ARN (aprox 1 mg de tejido) de extractos de cidro Etrog infectados con *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd* y *CBCVd* obtenidos mediante el método EVC y analizados con sondas ADNc-DIG por hibridación molecular Dot-blot. Resultados similares, fueron obtenidos con sondas DIG-ARN complementario, en los cuales *CEVd*, *HSVd* y *CBLVd* fueron detectables desde 64 hasta 320 ng de ARN total (Nakahara *et al.*, 1998b). Ensayos de sensibilidad, producto de la aplicación de controles positivos regenerados, sintetizados por transcripción in vitro y enriquecidos o “*spiked*” en ARN de material vegetal sano, sugieren una robusta sensibilidad diagnóstica. Este escenario reconstruye las uniones de las hebras ADNc homólogas marcadas con el conjunto de copias viroides transcriptas que acompañan y simulan las posibles interacciones con el ARN del hospedero, provocando que entre 320pg y 273pg de ARNvd sintético, la técnica consiga detectar la presencia del patógeno (**Fig.12**). Rodríguez *et al.*, (2003) realizaron ensayos de sensibilidad con la técnica Dot-blot y sondas quimioluminiscentes para Begomovirus, detectando entre 38-320pg de clones ADN del virus sembrado en la membrana. Por otro lado, la obtención de una sensibilidad entre 14-541ng de ADN de extractos de diferentes cultivares infectados con *MaYMV*, *TbLRV* y *BGYMV* fue reportado. Transcriptos in vitro del virus de la psorosis de los cítricos (*CPsV*) y el virus variegado de los cítricos (*CVV*) elaborados para ensayos de sensibilidad mediante hibridaciones Dot-blot con ribosondas-DIG, presentan una sensibilidad de 75pg de transcripto cuando se realizaron diluciones seriadas de ARNc con ARN total de material sano (controles *spike*) (Loconsole *et al.*, 2009). Resultados similares fueron obtenidos por Aparicio *et al.* (2009) mediante una ribosonda-DIG múltiple construida para la detección simultánea de 6 virus que afectan los cultivos de tomate. La sensibilidad reportada fue de al menos 50pg de ARN viral transcripto y no marcado, aplicado e hibridado en una membrana

mediante el formato Dot-blot. En nuestro estudio, el rango de detección para *CVd-VI* comprende los 321-107pg y para *CBCVd* los 273-91pg, sin embargo, diluciones de transcripto entre estos rangos no fueron evaluadas, lo que podría corresponder a que la sensibilidad de la técnica es comprobada entre 273-321pg pero podría corresponder a valores superiores de 91 y 107pg. Los beneficios en la utilización de sondas ADNc marcadas en frío para el diagnóstico de patógenos son interpretados en el desarrollo de este estudio. Las sondas ARN son consistentemente más lábiles que las sondas basadas en ADN, estas últimas no presentan los problemas de degradación que influyen en mayor proporción a la hebra simple de ARN. Además, como puntos favorables en el desarrollo metodológico de hibridaciones moleculares diagnósticas se destacan: el almacenamiento de la sonda ADN a bajas temperaturas por varios meses sin perder su efectividad (luego de varias acciones de descongelado), los bajos costos que implica el marcaje con digoxigenina en contraposición con los isótopos radiactivos y la fácil elaboración-manipulación de la sonda ADN-DIG frente a los riesgos en la salud-medio ambiente de material radiactivo (Kim *et al.*, 2010). Por otro lado, la utilidad en la elaboración de controles sintéticos viroides es expuesta por Hataya, (2009), el cual elabora controles positivos no infecciosos (in vitro) de *PSTVd* para ensayos RT-PCR, evitando la posibilidad de escape de un patógeno hipotético introducido para fines de investigación y sin la necesidad de los permisos fitosanitarios de entrada de material cuarentenario. Los análisis de especificidad y eficiencia ejecutados para el ensayo Northern blot para el diagnóstico de *CBCVd* y *CVd-VI*, revelan que en membranas independientes, cada una de las sondas específicas consigue discriminar entre otros viroides cítricos que posee la muestra, es decir, no hay reacciones cruzadas entre ARNvd no específico con ADNc-DIG específico. Algunos viroides, que en ciertos casos mantienen regiones de secuencia altamente similares con *CBCVd* y *CVd-VI*, por ejemplo *CEVd* / *HSVd* o *CDVd* / *CBLVd* respectivamente, no reaccionaron con las sondas específicas aplicadas para los viroides de este estudio, a pesar de que las muestras contenían un título viroide amplificado debido al tejido cidro hospedero (**Fig.13**). Diferentes variedades de cultivos cítricos comerciales no mostraron señales positivas para las sondas empleadas de manera independiente, a pesar de que todas las muestras se diagnosticaron como infectadas con alguna combinación de viroides cítricos (Umaña *et al.*, 2010, Pagliano *et al.* 2010b), excepto *CBCVd* y *CVd-VI*. Lo anterior refleja una especificidad diagnóstica robusta y una alta eficiencia de la técnica para segregar patógenos viroides o secuencias similares que no se acoplen totalmente

con la sonda, lo que en conjunto con la sensibilidad reportada anteriormente, indica que la metodología empleada para diagnóstico genera confiabilidad en los resultados.

Relevamiento de variedades cítricas en zonas de importancia nacional: diagnóstico molecular de *CBCVd* y *CVd-VI*.

El material colectado de diferentes zonas citrícolas de Uruguay, de variedades comerciales a campo (sin el pasaje a planta indicadora), representa un muestreo actualizado e innovador en nuestro país. El cual mantiene como finalidad, diagnosticar la presencia de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* con el uso de una técnica molecular confiable, previamente demostrada en este estudio. La recolección dirigida principalmente hacia árboles que presentaban algún tipo de síntoma de etiología viroide como enanismo, descascarado o descortezado, asegura la presencia de un complejo de viroides co-infectando el material, situación reportada ampliamente, y que trae consigo el aumento de la probabilidad de presencia de *CBCVd* y *CVd-VI* en estas muestras. El relevamiento en diferentes épocas del año, lo que conlleva a diferentes temperaturas en el entorno del crecimiento de la planta infectada, no es un factor determinante en cuanto al título viroide y a la determinación diagnóstica (Murcia *et al.*, 2009). Lo anterior se observa en resultados de hibridaciones Northern blot del capítulo 1, los cuales son ensayados con variedades colectadas en diferentes meses del año y que no presentan irregularidades en las señales, ni resultados erráticos persistentes según mes-temperatura-diagnóstico. Las zonas seleccionadas para el relevamiento son regiones de importancia citrícola variable entre ellas, pero todas se encuentran ubicadas como departamentos productores relevantes a nivel nacional. Las 84 muestras obtenidas de 13 variedades de cultivares comerciales y portainjertos, provenientes de 6 departamentos de Uruguay y sometidas a diagnóstico molecular de *CBCVd* y *CVd-VI*, representan un relevamiento específico único en el país. La cantidad y diversidad de material vegetal colectado, nos permite concluir posibles tendencias en la presencia/ausencia viroide, como también la ocurrencia-distribución de estos viroides en Uruguay (**Tabla 3**). Diferentes autores concluyen resultados de ocurrencia y distribución de viroides cítricos entre países, regiones o dentro de cada país, mediante muestreos extensivos de material vegetal de plantaciones citrícolas y aplicando hibridaciones moleculares con sondas marcadas con digoxigenina. Ejemplo de ello, Serra *et al.* (2008b) analiza 63 muestras de 7 variedades cítricas, 23 muestras de 6 variedades (Nakahara *et al.*, 1998b), 89 muestras de 6 variedades (Murcia *et al.*, 2009), 74 muestras de 9 variedades (Velásquez *et al.*,

2005) y 24 muestras de 10 variedades (Mohamed *et al.*, 2009), entre algunos estudios. El diagnóstico nacional realizado para *CBCVd* y *CVd-VI* mediante análisis de rutina y membranas independientes, con la totalidad de las muestras colectadas, determina la ausencia de estos viroides en las plantaciones cítricas relevadas. Estos datos son reforzados por un análisis comparativo entre las intensidades de señal de los controles positivos y todos los resultados negativos de las 84 muestras, lo que indican una diferencia significativa entre las señales de diagnóstico positivo del patógeno y las señales tomadas como ausencia del mismo (**Fig.15**). La presencia del viroide *CBCVd* mantiene una tendencia de baja distribución mundial, además el viroide *CVd-VI* muestra una incidencia de aparición exclusivamente regional (Este de Asia). Por otro lado, en los países limítrofes con Uruguay (Argentina y Brasil), no se han reportado estos viroides, hasta este momento. Estos reportes podrían soportar la ausencia de estos viroides en Uruguay, junto con el origen reciente de los mismos y su baja distribución mundial como posibles causas por las cuales no han sido introducidos en el territorio nacional. Observaciones similares fueron realizadas por Malfitano *et al.* (2005) para el caso de *CBCVd* detectado actualmente en Italia en plantaciones de reciente implantación. Por otro lado, es posible que el flujo de material ilícito de países con *CBCVd* o *CVd-VI* detectados y distribuidos en sus plantaciones no se haya llevado a cabo en Uruguay, además de la posibilidad de controles fitosanitarios rigurosos en bloques de multiplicación y vivero en países de origen de material de propagación. Estas situaciones pueden explicar la ausencia de estos patógenos en Uruguay, sin embargo, la ocurrencia de viroides cítricos en plantaciones nacionales es alta, con la excepción de *CBLVd*. En esta misma línea, resultados obtenidos en un estudio de evaluación de la ocurrencia de todos los viroides cítricos, muestran la ocurrencia de infección de estos patógenos en plantaciones de Uruguay, revelando que entre un 62-66% del total de las muestras analizadas aparecen infectadas con al menos un viroide, entre ellos y con una alta frecuencia el *HSVd* (Umaña *et al.*, 2010, Pagliano *et al.*, 2010b).). Condiciones que derivan hacia una posible alerta en cuanto al potenciamiento de los síntomas de infección en plantas a campo provocado por efectos sinérgicos entre combinaciones de viroides, por ejemplo *HSVd* y *CBCVd*, los cuales podrían co-infectar una misma planta (Vernière *et al.*, 2006). Es de importancia destacar, que la permanencia de viroides en huéspedes alternativos como plantas ornamentales, silvestres o malezas, causando o no sintomatología, es de relevancia para el Sistema de Cuarentena y Vigilancia Fitosanitaria en el sentido de erradicación y

saneamiento de cultivares. Estas especies silvestres y ornamentales actuarían como reservorios naturales de posibles organismos patógenos con estatus cuarentenario (Verhoeven *et al.*, 2004; Bostan *et al.*, 2004; Matousek *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2006 y 2009). Lo anterior, impulsa al avance de posibles medidas de prevención basadas en diagnósticos de germoplasma cítrico con herramientas moleculares disponibles. El desarrollo e implementación de la herramienta biotecnológica Northern blot con sondas no radiactivas, proyectada en este estudio, responde a la necesidad de técnicas moleculares de diagnóstico, que puedan ser implementadas y utilizadas en un Plan Nacional de Saneamiento de Material de Propagación Vegetal, específicamente en el Programa de Certificación Citrícola de Uruguay. Estas herramientas podrían facilitar el análisis de un buen número de muestras y a su vez proporcionar resultados diagnósticos confiables, rápidos y de un costo intermedio. La propuesta para la utilización de ésta metodología de diagnóstico para los viroides *CBCVd - CVd-VI* y viroides en general, se basa en el tamizaje inicial de muestras de los bloques fundación y de material en Cuarentena, seguidamente, determinar las muestras que reaccionaron a la sonda (hibridación Northern blot positiva) y descartarlas. Posteriormente, el material vegetal que se presenta como libre de viroides debe de sufrir una re-inspección con una técnica molecular alternativa, como por ejemplo RT-PCR en condiciones de máxima optimización, para reforzar en paralelo los resultados obtenidos por la hibridación molecular. Esta propuesta conlleva que, en el primer punto del diagnóstico, se obtengan resultados con una elevada certeza de presencia/ausencia de patógenos en material de propagación e impulse a una re-discusión metodológica del uso y acompañamiento de las plantas cidro Etrog bioamplificadoras de viroides en el proceso de diagnóstico.

Conclusiones

1. La cuantificación del ARN recuperado de cuatro métodos de extracción viroide evaluados, reflejan una gran variabilidad en cuanto a concentración y pureza. Sin embargo, hemos demostrado con un análisis comparativo mediante diferentes herramientas moleculares de detección basadas en reacciones enzimáticas de amplificación por PCR o en hibridación con sondas de ADNc marcadas, que en nuestras condiciones experimentales, el método EVC, recupera una elevada cantidad de copias de ARNvd de alta pureza a partir de variedades cítricas a campo.
2. Los análisis comparativos de la resolución diagnóstica entre los cuatro métodos de extracción viroide empleados y las herramientas moleculares de detección aplicadas indican que la calidad de los datos obtenidos está principalmente afectada por la combinación método de extracción de ARN-técnica molecular utilizada.
3. Hemos determinado que la combinación del método EVC-Northern blot es el más apto para el desarrollo de ensayos diagnósticos de alta resolución, sensibles y eficientes para la detección de viroides cítricos directamente de material vegetal a campo, sin tener que recurrir a una etapa de bioamplificación en plantas indicadoras.
4. En base a los valores de cuantificación de las señales producidas en los ensayos diagnósticos Northern blot de diferentes variedades cítricas y utilizando un criterio arbitrario de presencia/ausencia del patógeno definimos un *cut-off* o intervalo de infección que comprende entre 60UR y 160UR aproximadamente.

5. La cuantificación mediante densitometría de las señales detectadas en los ensayos diagnósticos Northern blot de muestras de 14 plantas de cuatro variedades cítricas (naranja, mandarina, limón, pomelo) permitió establecer un intervalo (en Unidades Relativas) que permitiría la detección confiable de la presencia de viroides en estas variedades. Este intervalo estaría definido entre un límite de detección arbitrario (presencia/ausencia del patógeno) o *cut-off* (60UR) y el límite de saturación de la señal detectada en la autorradiografía (160UR).
6. La obtención de vectores recombinantes de los viroides *CBCVd* y *CVd-VI* a partir de los plásmidos cedidos facilita la optimización de las reacciones de amplificación del genoma completo de estos patógenos y conduce al almacenamiento de estos controles positivos para futuras utilidades.
7. Mediante análisis RT-PCR con cebadores específicos para las especies *CBCVd* y *CVd-VI* dirigido a material vegetal cidro Etrog, hemos demostrado que las transcripciones reversas para fines diagnósticos pueden tornarse erráticas para estos viroides. A su vez, las condiciones de transcripción reversa en nuestros análisis precisan el uso de enzimas termoestables para maximizar la accesibilidad en la estructura viroide nativa y cebadores complementarios exclusivos para generación de ADNc y así evitar interacciones entre cebadores y ARNs del hospedero.
8. Las transcripciones reversas en material cidro Etrog infectado con *CBCVd* y en ARN copia de *CVd-VI*, permiten la posible recuperación y amplificación de estos viroides para fines de clonación pero no con utilidades diagnósticas en nuestras condiciones, debido a los artefactos frecuentemente obtenidos.
9. Las sondas sintetizadas y marcadas eficientemente para el diagnóstico de *CBCVd* y *CVd-VI* mediante hibridaciones moleculares presentan un robusto acoplamiento con fragmentos que corresponden al genoma ADNc, ARNc y ARNvd de estas especies. Sin embargo hemos demostrado que la similitud de secuencia que comparten estas especies con otros viroides cítricos se expresa con apareamientos imperfectos de la sonda formando híbridos ADNc-ADN-DIG de baja intensidad de señal pero nunca híbridos ARN-ADN-DIG inespecíficos.

10. Se ha implementado a nuestras condiciones un método de diagnóstico molecular altamente sensible, específico, repetible y confiable para los viroides cítricos *CBCVd* y *CVd-VI*, basado en hibridaciones del tipo Northern blot utilizando sondas marcadas no radiactivas. A su vez, este protocolo es efectivo para el diagnóstico de todos los viroides cítricos en material vegetal a campo y de diferentes variedades comerciales.
11. Los transcritos monoméricos sintetizados para las especies *CBCVd* y *CVd-VI* utilizados como controles positivos regenerados, facilitan el manejo de patógenos que podrían ser cuarentenarios en Uruguay. Indicando que su uso podría favorecer al estudio y manipulación de estos viroides sin correr el riesgo de escape de este material no infectivo en plantaciones nacionales.
12. La disponibilidad de la técnica molecular implementada en este estudio ha permitido realizar el diagnóstico de *CBCVd* y *CVd-VI* en plantaciones cítricas de importancia comercial, en base a un muestreo exploratorio significativo de variedades cítricas con síntomas de infección viroide y asintomáticas. Reportamos, en base al amplio tamaño de la muestra, la inexistencia de *CBCVd* y *CVd-VI* en las plantaciones examinadas, generalizando su ausencia en Uruguay.
13. La utilización de la herramienta biotecnológica Northern blot disponible, se recomienda para chequeos sistemáticos del germoplasma cítrico nacional enmarcado en un Plan de Saneamiento Cítrico de Material Propagativo y eventuales prospecciones sanitarias que tengan como objetivo el control y la erradicación de todos los viroides cítricos descriptos hasta el momento.

Bibliografía.

- 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.
- Antignus, Y., Lachman, O y Pearlsman, M. 2007. Spread of Tomato apical stunt viroid (TASVd) in greenhouse tomato crops is associated with seed transmission and bumble bee activity. *Plant Dis.* 91: 47-50.
- Aparicio, F., Soler, S., Aramburu, J., Galipienso, L., Nuez, F., Pallás, V y López, C. 2009. Simultaneous detection of six RNA plant viruses affecting tomato crops using a single digoxigenin-labelled polyprobe. *Eur J Plant Pathol.*, 123:117-123.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R y Bar-Joseph, M. 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research.* 19 (17), 4767.
- Badiee, A., Eiken, H.G., Steen, V.M., Lovlie, R. 2003. Evaluación of five different cDNA labeling methods for microarrays using spike controls. *BMC Biotechnol.* 3:23.
- Bani Hashemian, S. M., Serra, P., Barbosa, C.J., Juárez, J., Aleza, P., Corvera, J.M., Lluch, A., Pina, J.A y Duran-Vila N. 2009. Effect of a field-source mixture of citrus viroids on the performance of 'Nules' Clementine and 'Navelina' sweet orange trees grafted on Carrizo Citrange. *Plant Disease.* 93(7), 699-707.
- Bani Hashemian S.M., Taheri, H., Duran-Vila, N y Serra, P. 2010. First Report of Citrus viroid V in Moro Blood Sweet Orange in Iran. *Plant Disease.* 94 (1):129.
- Barbosa, C.J., Pina, J.A., Navarro, L y Duran-Vila, N. 2002. Replication / accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y da Graça, J.V (Eds.). *Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV).*Riverside, CA. pp 264-277.

- Barbosa, C.J., Serra, P., Pina, J.A., Navarro, L., Darós, J.A., Flores, R y Duran-Vila, N. 2005a. Identification and preliminary characterization of a viroid-like RNA in *Atalantia citroides*. In: Hilf, M.E, Duran-Vila, N y Rocha-Peña M.A (Eds.) Proceedings XVI International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV). Riverside CA. pp.264-271.
- Barbosa, C.J., Pina, J.A., Pérez-Panadés, J., Bernad, L., Serra, P., Navarro, L y Duran-Vila, N. 2005b. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease*. 89:749-754.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R y Lee, R.F.1989. The continuous challenge of Citrus Tristeza Virus control. *Ann. Rev. Phytopathol.* 27: 291-316
- Baumstark, T., Schröder, A.R.W y Riesner, D. 1997. Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *The EMBO Journal*. 16(3), 599-610.
- Bernad, L., Moreno, P., Bové, J.M y N. Duran-Vila. 2005. Viroids in Gummy Bark Sources from the Sultanate of Oman. In: Hilf, M.E, Duran-Vila, N y Rocha-Peña M.A (Eds.) Proceedings XVI International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV). Riverside CA. pp.272-279.
- Bernard, L y Duran-Vila, N. 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes*. 20:105-13.
- Bostan, H., Nie, X y Singh, R. P. 2004. An RT-PCR primer pair for the detection of Pospiviroids and its application in surveying ornamental plants for viroids. *J. Virol. Methods*.116(2), 189-193.
- Branch, A.D y Robertson, H.D. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science*. 223:450-454.
- Brlansky, R.H y Timmer, L.W. 2010. Exocortis, Cachexia and other Viroids. In: SP-43 (PP-179) Florida Citrus Pest Management Guide. Cooperative Extension Service, IFAS, University of Florida, Gainesville. pp1-2.

- Broadbent, P., Nicholls, P y Freeman, B.1988. Effect of graft-transmissible dwarfing agents on lemons. In: Garnsey, S.M., Timmer, L.W, y Dodds, J.A (Eds.). Proceedings X International Conference of the Organization of Citrus Virologists. Riverside, CA. pp 211-218.
- Bruno, Y. 2009. Citricos: Situación y perspectivas. En: Anuario de la Oficina de Programación y Política Agropecuaria (OPYPA), MGAP Uruguay.179-196.
- Bruno, Y. 2003. La citricultura en Uruguay. Contribución a su conocimiento. MGAP-DIEA. 31 p.
- Calavan, E.C., Frolich, E.F., Carpenter, J.B., Roistacher, C.N y Christiansen, D.W. 1964. Rapid indexing for exocortis of citrus. *Phytopathology*. 54: 1359-1362.
- Cañizares, M.C., Marcos, J.F y Pallás, V. 1998 Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus americana*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Hort*. 472(1), 581–587.
- Cañizares, M., Marcos, J y Pallás, V.1999. Molecular characterization of an almond isolate of hop stunt viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *Eur. J. Plant Pathol*. 105: 553-558.
- Cao, M.J., Liu, Q., Wang, X.F., Yang, F.Y y Zhou, C.Y. 2010. First Report of Citrus bark cracking viroid and Citrus viroid V Infecting Citrus in China. *Plant Disease*. 94(7), 922.
- Carstens, E.B. 2010. Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2009). *Arch Virol*. 155:133-146.
- Chomczynski, P y Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1), 156-159.
- Codoñer, F.M., Daros, J.A., Sole, R.V., Elena, S.F. 2006. The fittest versus the flattest: experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathog*. 2(12):e136.
- Cohen, O., Batuman, O., Moskowitz, Y., Rozov, A., Gootwine, E y Bar-Joseph, M. 2005. Goat-horns: platforms for viroid transission to fruit trees? *Phytoparasitica*. 33:141-148.

- Cohen, O., Batuman, O., Stanbekova, G., Sano, T., Mawassi, W y Bar-Joseph, M. 2006. Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes*. 33:287-292.
- Conejero, V., Belles, J.M., Garcia-Brejo, F., Garro, R., Hernandez-Yago, J., Rodrigo, I y Vera, P. 1990. Signalling in viroid pathogenesis. In: *Recognition and Response in Plant Virus Interactions.*, Fraser R.S.S., (Eds). NATO ASI Series. Vol. H 41: 233-261.
- Daros, J.A., Elena, S.F y Flores, R. 2006. Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep*. 7:593-598.
- Denti, M.A., Boutla, A., Tsagris, M yTabler, M. 2004. Short interfering RNAs specific for Potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J*. 37: 762-769.
- Ding, B y Itaya, A. 2007. Viroid: A useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol. Plant Microbe Interact*. 20:7-20.
- Ding, B y Wang, Y. 2009. Viroids: uniquely simple and tractable models to elucidate regulation and cell-to-cell trafficking of RNA. *DNA and Cell Biology*. 28:1-6.
- Duran-Vila, N., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R y Semancik, J. S. 1988a. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *J. Gen. Virol*. 69: 3069-3080.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A., Ballester, J.F., Juarez, J., Roistacher C.N., Rivera-Bustamante, R y Semancik, J.S 1988b. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. In: Garnsey, S.M., Timmer, L.W, y Dodds, J.A (Eds.). *Proceedings X International Conference of the Organization of Citrus Virologists, (IOCV)*. Riverside, CA. pp 152-164.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A y Navarro, L. 1991. Exclusion and/or uneven distribution of viroids in four citrus hosts. In: Brlansky, R.H., Lee R.F y Timmer, L.W (Eds.). *Proceedings XI International Conference of the Organization of Citrus Virologists, (IOCV)*.Riverside, CA. pp 219-223.
- Duran-Vila, N., Pina, J.A y Navarro, L. 1993. Improved indexing of citrus viroids. In: Moreno, P., Da Graca, J.V y Timmer L.W. *Proceedings XII Conference of the*

- International Organization of Citrus Virologists (IOCV), Riverside. pp. 202–211.
- Duran-Vila, N y Semancik, J.S. 2003. Citrus viroids. In: Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W y Semancik, J.S (Eds.). *Viroids*. Collingwood. CSIRO Publishing. pp. 178-194.
- Du, Z., Jin, B., Liu, W., Chen, L y Chen, J. 2007. Highly sensitive fluorescent-labeled probes and glass slide hybridization for the detection of plant RNA viruses and viroid. *Acta Biochim Biophys Sin.* 39 (5), 326-334.
- Eigen, M. 1993. The origin of genetic information: Viruses as models. *Gene*.135: 37-47.
- Eiras, M., Rodrigues Silva, S., Sanches Stuchi, E., Penteado Natividade Targon, M.L y Alves Carvalho, S. 2009. Viroides em citros. *Tropical Plant Pathology.* 34 (5), 275-296.
- Eiras, M., Kitajima, E.W., Flores, R y Daros, J.A. 2007. Existence in vivo of the loop E motif in potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* 152, 1389-1393.
- Elleuch, A., Fakhfakh, H., Jendoubi, L., Bessaies, N y Marrakchi, M. 2003. Comparative analysis of techniques for detection of grapevine and citrus viroids in Tunisia. *OEPP/EPPO Bulletin.* 33:369-374.
- Flores, R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C.R. Acad. Sci. III.* 324 (10), 943-952.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez de Alba, E., Darós, J.A y Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:117-139.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M y Diener, T.O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch Virol.* 143: 623-629.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., Diener, T.O. 2000. Viroids. In: van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carstens, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringue, C.R y Wickner, R.B (Eds). *Virus taxonomy*. Academic Press. 1009-1024.
- Foissac, X y Duran-Vila, N. 2000. Characterization of two citrus apscaviroids isolated in Spain. *Arch. Virol.* 145:1975-1983.

- Gago, S., Elena, S.F., Flores, R y Sanjuan, R. 2009. Extremely high mutation rate of a hammerhead viroid. *Science*. 323:1308
- Garnsey, S.M., Zies, D.L., Irey, M., Sieburth P.J., Semancik, J.S., Levy, L y Hilf, M.E. 2002. Practical Field Detection of Citrus Viroids in Florida by RT-PCR. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y da Graça, J.V (Eds.). *Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV)*.Riverside, CA. pp 219-229.
- Gómez, G y Pallás, V. 2004. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. *J Virol*. 78: 10104-10110.
- Gómez, G. y Pallás, V. 2007. Mature monomeric forms of Hop stunt viroid resist RNA silencing in transgenic plants. *Plant J*. 51(6), 1041-1049.
- Gora-Sochacka, A. 2004. Viroids: unusual small pathogenic RNAs. *Acta Biochim. Pol*. 51: 587-607
- Hataya, T. 2009. Duplex reverse transcription-polymerase chain reaction system to detect Potato spindle tuber viroid using an internal control mRNA and a non-infectious positive control RNA. *J Gen Plant Pathol*. 75:167-172.
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H y Vogt, P.H. 1997. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Bio- Techniques*. 23:504-511.
- International Potato Center (CIP). 1997. Preparation of ³²P-labeled probes by RNA transcription. In: *Techniques in Plant Virology. Training Manual*. Salazar, L.F y Jayasinghe, U. (Eds). Sections 3, 4, 5. Lima Peru: International Potato Center (CIP).
- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A.R., Molina, C., Nelson, R.S y Ding, B. 2007. A structured viroid RNA is substrate for Dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RISC-mediated degradation. *J. Virol*. 81:2980-2994.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K y Ito, T. 2001. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Arch. Virol*. 146:975-982.

- Ito, T., Ieki H., Ozaki, K., Iwanami, T., Nakahara, K., Hataya, T., Ito, T., Isaka, M y Kano, T. 2002a. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*. 92:542-547.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K. 2002b. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 106(2), 235-239.
- Ito, T., Namba, N y Ito, T. 2003. Distribution of citrus viroids and Apple stem grooving virus on citrus trees in Japan using multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J Gen Plant Pathol*. 69:205-207.
- Ito, T y Ohta, S. 2010. First report of Citrus Viroid V in Japan. *J. Gen Plant Pathol*. 1 (3):1345-2630
- Kapari-Isaia, T., Kyriakou, A., Papayiannis, L., Tsaltas, D., Gregoriou S y Psaltis, I. 2008. Rapid in vitro microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology*. 57:348-353.
- Keese, P., Visvader, J y Symons, R. 1988. Sequence variability in plant viroid RNAs. In: Domingo, E., Holland, J y Ahlquist, P (Eds.). *RNA Genetics*, vol. III, Boca Raton: CRC Press. pp. 71-98.
- Keese, P. y Symons, R.H. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 4582-4586.
- Kim, S.W., Li, Z., Moore, P.S., Monaghan, A.P., Chang, Y., Nichols, M y John, B. 2010. A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res*. 38(7), 1-7.
- Koltunow, A. M. y Rezaian, M. A. 1989. A scheme for viroid classification. *Intervirology*. 30:194-201.
- Kyriakou, A., Ioannou, M., Hadjinicolis, A., Hoffman, R., Antoniou, E., Papayiannis, L., Kapari-Isaia, T y Ioannou, N. 2005. Citrus Exocortis and Cachexia Viroids Affect Growth, Yield and Fruit Quality of Lapithou Lemon on Sour Orange Rootstock in Cyprus. In: Hilf, M.E., Duran-Vila, N., Rocha-Peña, M.A(Eds.). *Proceedings XVI Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Riverside. pp. 257-263.

- Lee, R.F. 2009. Citrus IPM. In: Radcliffe, E.B., Hutchison, W.D y Cancelado, R.E (Eds.). Integrated Pest Management. Cambridge University Press. pp 342-353.
- Li, S.F., Onodera, S., Sano, T., Yoshida, K., Wang, G.P y Shikata, E. 1995. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 61:381-390.
- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S y Lucas, W.J. 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol. Cell. Proteomics.* 8: 343-356.
- Loconsole, G., Fatone, M.T y Savino, V. 2009. Specific digoxigenin-labelled riboprobes for detection of Citrus Psorosis Virus and Citrus Variegation Virus by molecular hybridization. *J. Plant Pathol.* 91 (2), 311-319.
- Manchester, K. L. 1995. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Bio-Techniques.* 19:208-212.
- Malfitano, M., Barone, M., Duran-Vila, N y Alioto, D. 2005. Indexing of viroids in Citrus orchards of Campania, southern Italy. *J. Plant Pathol.* 87(2): 115-121.
- Markarian, N., Li, H.W., Ding, S.W y Semancik, J.S. 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch. Virol.* 149:397-406.
- Matousek, J., Orctová, L., Ptáček, J., Patzak, J., Dedic, P., Steger, G y Riesner, D. 2007. Experimental transmission of pospiviroid populations to weed species characteristic of potato and hop fields. *J Virol.* 81(21):11891-11899.
- Miller, N.A., Gong, Q., Bryan, R., Ruvolov, M., Turner, L.A y LaBrie, S.T. 2002. Cross-hybridization of closely related genes on high-density microarrays. *BioTechniques.* 32:620-625.
- Mohamed, ME., Hashemian, SMB., Dafalla, G., Bove, JM., Duran-Vila, N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *J. Plant Pathol.* 91:185-190.

- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A., Duran-Vila, N. 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*. 23:95-102.
- Nakahara, K., Hataya, T y Uyeda, I. 1998a. Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Res.* 26 (7):1854-1856.
- Nakahara, K., Hataya, T., Uyeda, I y Ieki, H. 1998b. An improved procedure for extracting nucleic acids from citrus tissues for diagnosis of citrus viroids. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64:532-538.
- Nakahara, K., Hataya, T y Uyeda I. 1999. A simple rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridisation and RT-PCR. *J Virol Methods.* 77:47-58.
- Nakaune, R y Nakano, M. 2008. Identification of a new *Apscaviroid* from Japanese persimmon. *Arch. Virol.* 153: 969-972.
- NAPPO. 2008. NRMF N°16: Directrices para la importación de material propagativo de cítricos hacia un país miembro de la NAPPO. En: Normas Regionales de la NAPPO sobre Medidas Fitosanitarias (NRMF). Secretaría de la Organización Norteamericana de Protección a las Plantas (NAPPO), Canadá. p 14.
- Navarro, B y Flores, R. 1997. Chryzanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of viroids with hammerhead ribozymes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94:11262-11267.
- Navarro, B., Darós, J.A y Flores, R. 1998. Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for cloning small circular RNAs. *J. Virol. Methods.* 73, 1-9.
- Navarro, L., Pina, J.A., Juárez, J., Ballester-Olmos, J.F., Duran-Vila, N., Guerri, J., Moreno, P., Cambra, M., Zaragoza, S y Medina, A. 2002. The citrus variety improvement program in Spain (CVIPS) in the period 1975-2000. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y da Graça, J.V (Eds.). *Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. Riverside, CA. pp 306-316.
- Noronha Fonseca, M.E., Marcellino, L.H y Gander, E. 1996. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in Citrus

- medica with digoxigenin-labelled RNA probes. *Journal of Virological Methods*. 57 (2), 203-207.
- Ohno, T., Takamatsu, N., Meshi, T y Okada, Y. 1983. Hop stunt viroid: Molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11 (18), 6185-6197.
- Önelge, N. 2010. Citrus Viroids in Turkey. In: Duran-Vila, N., Hilf, M., Vidalakis, G. (Eds.). *Proceedings XVII Conference Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside CA.
- Owens, R.A y Hammond, R.W. 2009. Viroid pathogenicity: One process, many faces. *Viruses*. 1: 298-316.
- Pagliano, G., Orlando, L y Gravina A. 1998. Detección y caracterización del complejo de viroides de cítricos en Uruguay. *Agrociencia (Uruguay)*. 1 (2): 74-83.
- Pagliano, G., Peyrou, M., Del Campo, R., Orlando, L., Gravina, A., Wettstein, R y Francis, M. 2000a. Detection and Characterization of Citrus Viroids in Uruguay. In: Da Graça, J.V., Lee, R.F y Yokomi, R.K (Eds.) *Proceedings XIV Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA. pp 282-288.
- Pagliano, G. 2000b. Detección molecular de viroides cítricos presentes en plantaciones del Uruguay. Tesis para optar el grado de Máster en Biotecnología de Plantas. Huelva-España.135pp.
- Pagliano, G; Umaña, R; Rivas, F and Pritsch, C. 2010a. Diagnostic parameters of Northern blot hybridization technique for detection of citrus viroids in Uruguay. In: Duran-Vila, N; Da Graça, J; Hilf, M and Vidalakis G (Eds.). *Proceedings XVIII Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Campinas, SP, Brazil. *Citrus: Research and Technology*, 31 (2), pp.125
- Pagliano, G; Umaña, R; Rivas, F and Pritsch, C. 2010b. Diagnosis update and occurrence of citrus viroids in Uruguay. In: Duran-Vila, N; Da Graça, J; Hilf, M and Vidalakis G (Eds.). *Proceedings XVIII Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, Campinas, SP, Brazil. *Citrus: Research and Technology*, 31 (2) pp.91

- Palacio, A., Romero-Durbán, J y Duran-Vila, N. 2004. Characterization of citrus HSVd isolates. *Arch. Virol.*149: 537-552.
- Palacio, A., Foissac, X y Duran-Vila, N. 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridisation. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 897-903.
- Palacio, A., Foissac, X y Duran-Vila N. 2000. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: comparison with other detection methods. In: Da Graça, J.V., Lee, R.F y Yokomi, R.K (Eds.). *Proceedings XIV Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA. pp. 294-301.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M y Tabler, M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29: 2395-2400.
- Pérez, J.M., Peña, I., Batista, L., Velázquez, K., Pérez, R., del Valle, N., Cueto, R y Aranguren, M. 2004. Actual situation of viruses or related diseases in Cuba. In: *APS, Caribbean Division Meeting Abstracts, Habana, Cuba. Publicación N° P-2005-0028-CRA.*
- Plata, M.I., Costa, N., Fabiani, A y Anderson, C. 2002. Characterization of Nine Sources of Dwarfing Factors Used in Tree Size Control Trials at Concordia, Argentina. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y Da Graça, J.V (Eds.). *Proceedings XV Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA. pp. 395-397.
- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R., Hadas, R., Bar-Joseph, M y Sanger, H.L. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd IV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res.*19: 6640.
- Qi, Y y Ding, B. 2003. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell.* 15: 2566-2577.
- Ragozzino, E., Faggioli, F y Barba, M. 2004. Development of a one tube-one step RT PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid. *J Virol Methods.* 121:25-29.

- Rakowski, A.G., Szychowski, J.A., Avena, Z.S y Semancik, J.S. 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J Gen Virol.* 75: 3581-3584.
- Reanwarakorn, K y Semancik, J.S. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology.* 89:568-574.
- Rivera-Bustamante, R.F., Gin, R y Semancik, J.S. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroidlike RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. *Anal. Biochem.* 156:91-95.
- Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klootz, G., Kleinschmidt, A.K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H.J y Sanger, H.L. 1979. Structure and structure formation of viroids. *J. Mol. Biol.* 133(1): 85-115.
- Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R y Di Serio, F. 2006. Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: Uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J. Gen.Virol.* 87: 231-240.
- Rodríguez, R., Ramos, P.L., Dorestes, V., Velásquez, K., Peral, R., Fuentes, A y Pujol, M. 2003. Establishment of a Non-Radioactive Nucleic Acid Hybridization Technique for Begomovirus Detection. *Biotechnologa Aplicada.* 20:164-169.
- Roistacher, C.N., Calavan, E.C., Blue, R.L., Navarro, L y Gonzales, R. 1977. A new more sensitive citron indicator for the detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEVd). *Plant Dis Rep.* 61:135-139.
- Roistacher, C.N., Canton, H y Reddy, P.S. 1995. Severe decline of citrus on exocortis-susceptible rootstocks in Belize and the costs incurred by the use of infected budwood. In: *Proc. 3rd Int. Workshop on Citrus tristeza virus and the brown citrus aphid in the Caribbean Basin: Management Strategies.* Lake Alfred, Florida. pp 130-138.
- Saade, M., Aparicio, F., Sanchez-Navarro, J.A., Herranz, M.C., Myrta, A., Di Terlizzi, B y Pallas, V. 2000. Simultaneous detection of the three ilarviruses affecting stone fruit trees by nonisotopic molecular hybridization and multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction. *Phytopathology.* 90:1330-1336.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F y Maniatis.T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2. ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp 9.52.
- Sanches Stuchi, E., Rodrigues da Silva, S., Donadio, L.C., Sempionato, O.R., Reiff, E.T. 2007. Field performance of "marsh seedless" grapefruit on trifoliolate orange inoculated with viroids in Brazil. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*.64(6): 582-588.
- Schmitz, A y Riesner, D. 1998. Correlation between bending of the VM región and pathogenicity of different potato spindle tuber viroid strains. *RNA*. 4: 1295-1303.
- Schindler, I.M y Muhlbach, H.P. 1992. Involvement of nuclear DNA dependent RNA polymerases in potato spindle tuber viroid replication: a re-evaluation. *Plant Sci*. 84: 221-229.
- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H y Sängler, H.L. 1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *EMBO J*. 4: 2182-2190.
- Schröder, A.R y Riesner, D. 2002. Detection and analysis of hairpin II, an essential metastable structural element in viroid replication intermediates. *Nucleic Acids Res*. 30:3349–3359.
- Schwach, F., Vaistij, F.E., Jones, L y Baulcombe, D.C. 2005. An RNA dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol*. 138:1842-1852.
- Semancik, J.S., Morris, T.J., Weathers, L.G., Rordorf, G.F y Kearns, D.R. 1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 63:160-167.
- Semancik, J.S. 1986. Separation of viroid RNAs by cellulose chromatography indicating conformational distinction. *Virology*. 155:39-45.
- Semancik, J.S., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R y Duran-Vila, N. 1988. Citrus cachexia viroid, a new disease of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J Gen Virol*. 69: 3059-3068
- Semancik, J.S y Vidalakis, G. 2005. The question of *Citrus viroid IV* as a *Cocadviroid*. *Archives of Virology*. 150: 1059-1067.

- Semancik, J.S., Szychowski, J.A., Rakowski, A.G y Symons, R.H. 1994. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *Journal of General Virology*. 75:727-732.
- Serra, P., Barbosa, C.J., Daròs, J.A., Flores, R y Duran-Vila, N. 2008a. *Citrus viroid V*: molecular characterization and synergistic interactions with other members of the genus *Apscaviroid*. *Virology*. 370:101-112.
- Serra, P., Eiras, M., Bani Hashemian, S.M., Murcia, N., Daròs, J.A., Flores, R., Kitajima, E.W y Duran-Vila, N. 2008b. Citrus viroid V: occurrence, host range, diagnosis and identification of new variants. *Phytopathology*. 98:1199-1204.
- Sieburth PJ, Irey M, Garnsey SM, Owens RA. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y da Graca, J.V (Eds.). *Proceedings XV Conference Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA. pp 230-239.
- Singh, R.P., Dilworth, A. D., Ao, X., Singh, M y Baranwal, V.K. 2009. *Citrus exocortis viroid* transmission through commercially-distributed seeds of *Impatiens* and *Verbena* plants. *Eur. J Plant Path.* 124:691-694.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Baranwal, V.K y Gupta, K.N. 2006. Detection of Citrus exocortis viroid, Iresine viroid, and Tomato chlorotic dwarf viroid in New Ornamental Host Plants in India. *Plant Disease*. 90 (11): 1457.
- Su, H.J. 2008. Production and Cultivation of Virus-free Citrus Saplings for Citrus Rehabilitation in Taiwan. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi and Asia-Pacific Association of Agricultural Research Institutions, Bangkok.
- Szychowski, J.A., Vidalakis, G y Semancik J.S. 2005. Host directed processing of *Citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology*. 86: 473-477.
- Tabler, M y Tsagris, M. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends Plant Sci*. 9: 339-348.
- Takeda, R y Ding, B. 2009. Viroid intercellular trafficking, RNA motifs, cellular factors and broad impacts. *Viruses*. 1: 210-221.

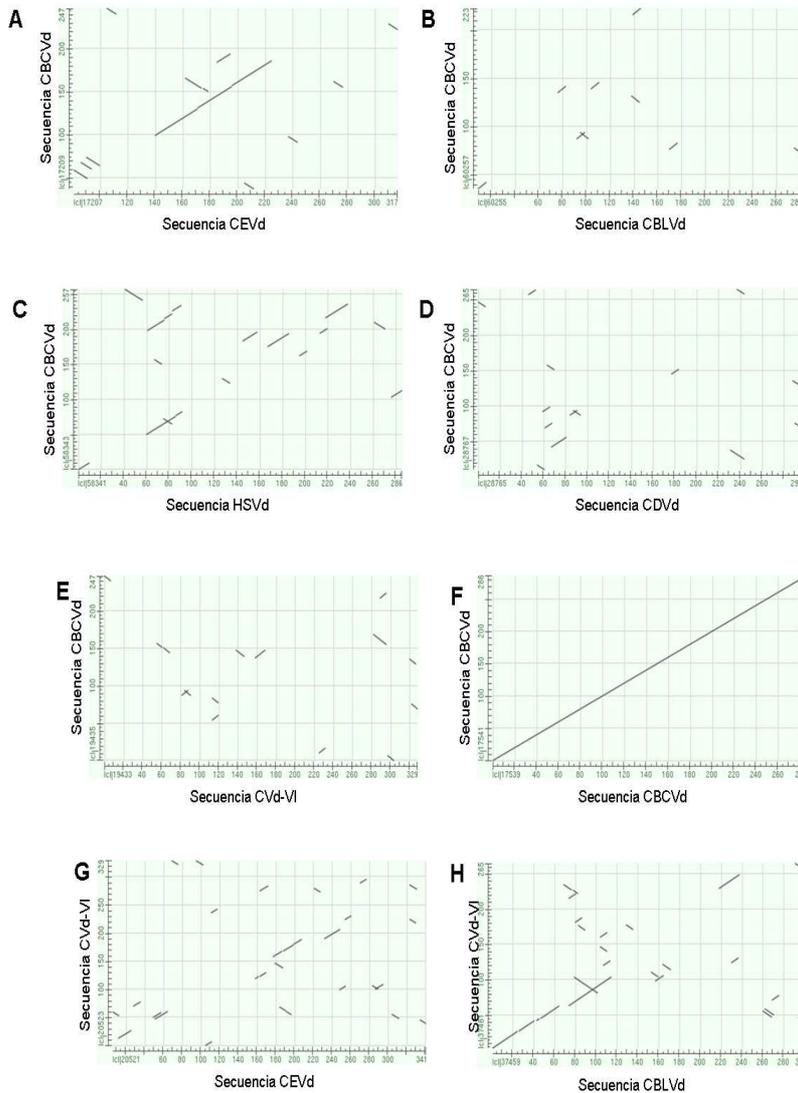
- Targon, M.L.P.N., Muller, G.W., Carvalho, S.A., De Souza, J.M y Machado, M.A. 2003. Detecção de viróides em citros através de hibridização de impressões de tecidos. *Summa Phytopathologica*. 29:60.
- Targon, M.L.P.N., Carvalho, A.S., Stuchi, E.S., Souza, J.M., Müller, G.W., Borges, K.M y Machado, M.A. 2005. Hybridization techniques for indexing of citrus viroids in São Paulo State, Brazil. *Laranja*. 26:25-38.
- Tatusova, T.A y Madden, T.L. 1999. BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett*. 174(2), 247-250.
- Tessitori, M., Rizza, S., Reina, A y La Rosa, R. 2004. Development of a real-time assay for simultaneous citrus viroids detection. *J Plant Pathol*. 86(4),336.
- Tessitori, M., Maria, G., Capasso, C., Catara, G., Rizza, S., De Luca, V., Catara, A., Capasso, A., Carginale, V. 2007. Differential Display analysis of gene expression in Etrog citron leaves infected by Citrus viroid III. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1769 (4):228-235.
- Trivedi, S., Shekhawat, G y Purohit, S. 2007. Analysis of similarities between viroid, prokaryote and eukaryote genomes to revisit theories of origin of viroids. *J. Cell Mol. Biol*. 6(1), 9-18.
- Umaña, R., Rivas, F., Pritsch, C., Arbiza, J y Pagliano, G. 2010. Actualización del diagnóstico molecular de viroides cítricos y ocurrencia en Uruguay. Pág. 14, En: *Memorias, Jornada Anual de Fitopatología (SUFIT)*. Montevideo, Uruguay.
- Vapnek, J. 2009. Legislatively Establishing a Health Certification Programme for Citrus. *FAO Legal Papers Online*.
- Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.E y Papadopoulou, P. 2002. Gas Chromatography-Mass Spectroscopy Analysis of Aromatic Compounds of Leaves and Peel from Healthy and Viroid-infected Citron Plants. In: Duran-Vila, N., Milne, R.G y da Graca, J.V (Eds.). *Proceedings XV Conference Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV)*. Riverside, CA. pp. 272-277.
- Velásquez, K. 2004. Caracterización biológica y molecular de viroides de cítricos de Cuba. Perfeccionamiento de su diagnóstico. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Ministerio de la Agricultura, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT). 114 pp.

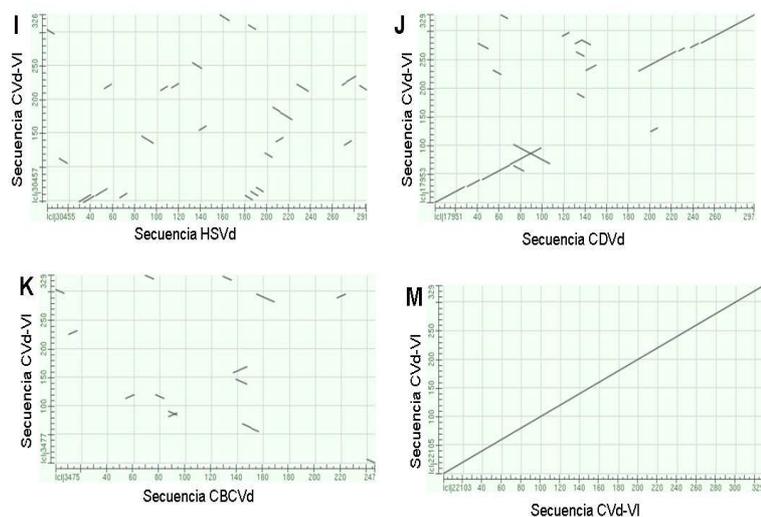
- Velásquez, K., Pérez, J.M., Batista, L., López, E., Yepe, S., Izquierdo, L., Peña, I., Cueto, J., Alvarez, M., Pérez, D., Rodríguez, D y Duran-Vila N. 2005. Improvement of Viroid Diagnosis and Determination of Viroid Presence in Cuban Citrus Areas. In: Hilf, M.E, Duran-Vila, N y Rocha-Peña M.A (Eds.) Proceedings XVI International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV). Riverside CA. pp.443-446.
- Verhoeven, J., Jansen, C.C.C., Willemsen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A y Roenhorst, J.W. 2004. Natural infections of tomato by Citrus exocortis viroid, Columnea latent viroid, Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. Eur. J. Plant Path. 110: 823-831.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., Bové, J.M y Duran-Vila, N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliolate orange. Phytopathology. 93:356-368.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., Bové, J. M y Duran-Vila, N. 2004. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield on Clementine trees grafted on trifoliolate orange. Plant Dis. 88: 1189-1197.
- Visvader, J.E., Forster, A.C y Symons, R.H. 1985. Infectivity and in vitro mutagenesis of monomeric cDNA clones of citrus exocortis viroid indicate the site of processing of viroid precursors. Nucleic Acids Research.13:5843-5856.
- Visvader, J.E y Symons, R.H. 1983. Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. Virology. 130:232-237.
- Wang, M.C., Lin J.J., Duran-Vila, N y Semancik, J.S. 1986. Alteration in cell wall composition and structure in viroid-infected cells. Physiol. Mol. Plant Path. 28:107-124.
- Wang, X., Zhou, C., Tang, K., Lan, J., Zhou, Y y Li, Z. 2008. Preliminary Studies on Species and Distribution of Citrus Viroids in China. Agricultural Sciences in China. 7(9): 1097-1103.

- Wang, X., Zhou, C., Tang, K., Zhou, Y y Li, Z. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *Eur J Plant Pathol.* 124:175-180.
- WenXing, X., Ni, H., QiuTing, J., Farooq, A.B.U., ZeQiong, W., YanSu, S., ChengChun, W., LiPing, W y GuoPing, W. 2009. Probe binding to host proteins: A cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization. *Virus Research.* 145(1), 26-30.
- Yang, X., Hadidi, A y Garnsey, S.M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroid from infected citrus hosts. *Phytopathology.* 82: 279-2

Anexos

Anexo 1. Graficas de regiones de similitud entre genomas viroides cítricos mediante alineamiento basado en BLASTn 2secuencias. La secuencia problema está representada en el eje x (los números representan las bases anotadas en esta secuencia). En el eje y se representa la secuencia del genoma completo de *CBCVd* o *CVd-VI*. Los alineamientos se muestran en la gráfica como líneas y el número de líneas indica la cantidad de anotaciones basadas en el alineamiento BLAST.





Anexo 2. Colecta de material vegetal de diferentes zonas cítricas de importancia nacional. Localización, zona, y código de las muestras de campo recolectadas para cada tipo de variedad (especie) a la que pertenece.

Localización	Muestra	Variedad (especie)
Canelones (Pando)	G030	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
	G031	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
	G052	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
	G054	Pomelo Marsh Seedless (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
Canelones (Este)	MolWN01	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	Mol167	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	Mol066	Pomelo Duncan (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
	Mol442	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
	Mol397	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	PWN15	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	P396	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
Montevideo (Punta Espinillo)	P441	Mandarina Murcott (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)
	PEWN01	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	PEWN02	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	PEWN03	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	PEWN04	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	PE390	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	PE391	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	PE392	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	Ockq01	Kumquat (<i>Fortunella. sp</i>)

Localización	Muestra	Variedad (especie)
San José (Kiyú)	K393	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	K394	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	K395	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	KWN05	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	KWN06	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	KWN07	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	Colonia (La Arenisca)	CDLKq02
CDL070		Pomelo Star ruby (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
CDL071		Pomelo Star ruby (<i>C. paradisi</i> (L.) Osb.)
CDL176		Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
CDL177		Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
CDL381		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
CDL382		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
CDL383		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
CDL384		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
CDL385		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
CDL386		Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
Colonia (San Pedro)		CC443
	CC398	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)
	CC399	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)

Localización	Muestra	Variedad (especie)
Salto (Est. Exp INIA SG)	ISGt32A	<i>Poncirus trifoliata</i>
	ISGt32B	<i>Poncirus trifoliata</i>
	ISGcvC	<i>C. volkameriana</i>
	ISGcvD	<i>C. volkameriana</i>
Salto (Est. Exp San Antonio,FAgro)	FAgS436	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
	FAgS437	Mandarina Satsuma (<i>Citrus unshiu</i>)
	FAgS438	Mandarina Murcott (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)
	FAgSWN13	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
Salto (Zona 1)	GS170	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	GS171	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	GS172	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	GS430	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
	GS431	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
	GS432	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
Salto (Zona 2)	MSWN08	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	MStt01	<i>Poncirus trifoliata</i>
	MS433	Mandarina Murcott (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)

Localización	Muestra	Variedad (especie)
Salto (Zona 3)	PqL1S173	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	PqL1S174	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	PqL1S175	Naranja Valencia late (<i>C. sinensis</i> (L.) Osb)
	PqL2WN09	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	PqL2WN10	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	VMS434	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
	VMS435	Mandarina común (<i>C. deliciosa</i>)
Salto (Zona 4)	DSzWN11	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	DSzWN12	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
	DSzSat01	Mandarina Satsuma Owari (<i>C. unshiu</i>)
	DSzSat02	Mandarina Satsuma Owari (<i>C. unshiu</i>)
	DSzSat03	Mandarina Satsuma Owari (<i>C. unshiu</i>)
Salto (Zona 5)	AFS439	Mandarina Ellendale (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)
	AFS440	Mandarina Ellendale (<i>C. reticulata</i> x <i>C. sinensis</i>)
	AFSWN14	Naranja dulce Washington Navel (<i>C. sinensis</i>)
Rio Negro (Fray Bentos)	FB410	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB411	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB412	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)

Localización	Muestra	Variedad (especie)
Rio Negro (Fray Bentos)	FB413	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB414	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB415	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB416	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB417	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB418	Mandarina Satsuma (<i>C. unshiu</i>)
	FB380	Limón Lisbón (<i>C. limon</i>)