

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION ESTUDIOS DE POST-GRADO



VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL
EN EL CAMPO

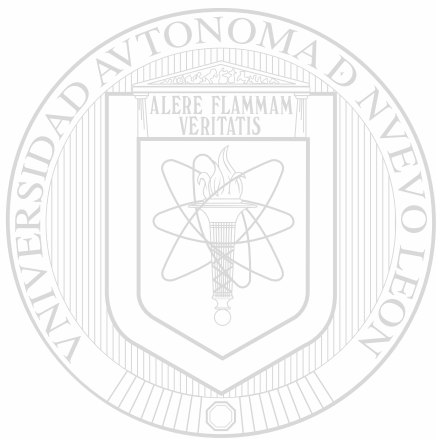
TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGIA

POR:

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

San Nicolás de los Garza, N. L., México Octubre de 1998



UNIVERSIDAD AUT
DIRECCIÓN GEN

OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

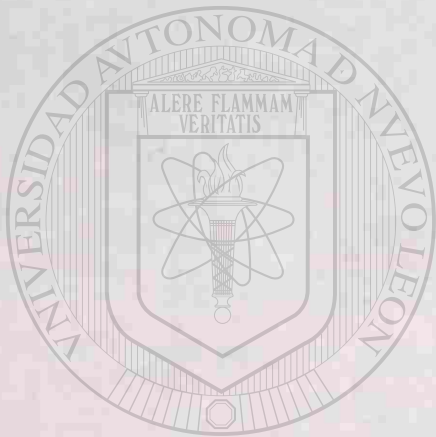
ANL

DE NUEVO LEÓN[®]
BIBLIOTECAS

TD
QR500
A4
c.1



1080087067



UANL

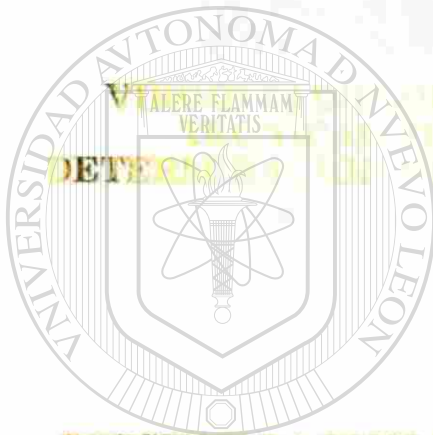
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

19662

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TEMA: IMPLEMENTACION DE
MÉTODOS DE DETECCIÓN Y
SELECCIÓN NATURAL EN EL CAMPO

TESIS
UANL

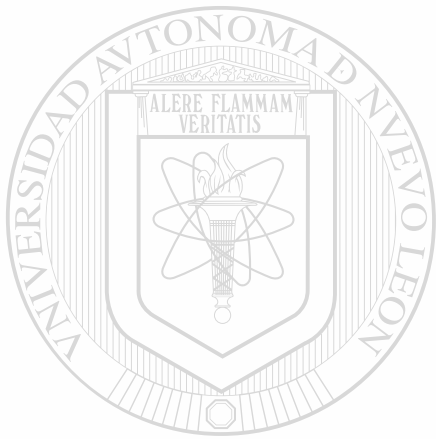
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
POR

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ





UANL

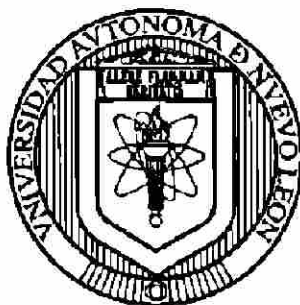
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL EN EL CAMPO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

COMISION DE APROBACION DE TESIS

Dr. Mario A. Rocha Peña
Director de Tesis

Dr. Juan Pablo Martínez Soriano
Co-director

Dr. Benito Pereyra Alférez
Asesor

Dr. Rafael Rivera Bustamante
Asesor

Dr. Richard F. Lee
Asesor

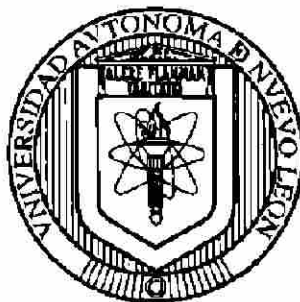
Dra. Ma. Julia Verde Star
Subdirectora de Postgrado

_____®

Richard F. Lee

Ma. Julia Verde Star

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**VIROIDES DE LOS CITRICOS: IMPLEMENTACION DE
TECNICAS MOLECULARES DE DETECCION Y
DETERMINACION DE INFECCION NATURAL EN EL CAMPO**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

POR

M. C. OMAR GUADALUPE ALVARADO GOMEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
COMISION DE EXAMEN

Dr. Mario Alberto Rocha Peña
Presidente

Dr. Benito Pereyra Alférez
Secretario

Dr. Juan Manuel Alcocer González
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Vocal

Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Vocal

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Octubre de 1998

CONTENIDO

	Pág.
Dedicatoria	I
Agradecimientos	II
Biografía del autor	IV
Abreviaturas y simbología	V
Lista de Cuadros	VII
Lista de Figuras	IX
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Hipótesis	2
1.2 Objetivos	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	
2.1 Identidad de los viroides	3
2.2 Ocurrencia, distribución e importancia en la agricultura	3
2.3 Caracterización	5
2.4 Viroides causantes de enfermedades en cítricos	5
2.4.1 Exocortis	6
2.4.2 Cachexia o xiloporosis	7
2.4.3 Otros viroides de cítricos	9
2.5 Extracción del RNA	11
2.5.1 Cromatografía del RNA en celulosa (CF-11)	11
2.6 Detección de viroides	11
2.6.1 Bioensayos en plantas indicadoras	12
2.6.2 Análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE)	12
2.6.3 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	13
2.6.4 Hibridación de ácidos nucleicos	13

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Fuente de viroides y material vegetal	16
3.2 Extracción del RNA.....	19
3.2.1 Cuantificación de la cantidad y calidad del RNA.....	22
3.3 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida	23
3.3.1 Establecimiento de la técnica.....	23
3.3.2 Comparación de métodos de extracción del RNA en la detección directa.....	27
3.3.3 Validación de la técnica.....	27
3.4 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa	27
3.4.1 Selección, análisis y síntesis de iniciadores (primers).....	27
3.4.2 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide cachexia.....	28
3.4.3 Establecimiento de las condiciones de reacción para el viroide exocortis.....	30
3.4.4 Validación de la técnica.....	30
3.5 Ensayo de hibridación por mancha de punto (dot blot).....	30
3.6 Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad.....	30

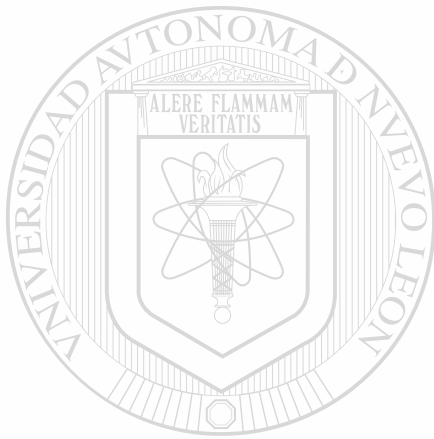
IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Extracción del RNA.....	32
4.2 Análisis del RNA por electroforesis en geles de poliacrilamida.....	37
4.2.1 Establecimiento de la técnica.....	37
4.2.2 Comparación de métodos de extracción del RNA para la detección directa de viroides por electroforesis secuencial (sPAGE).....	39
4.3 RT-PCR.....	42
4.3.1 Cachexia	42
4.3.2 Exocortis	45
4.4 Hibridación molecular.....	45
4.5 Transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad.....	47
4.6 Validación integrada de técnicas moleculares en diversos hospedantes.....	49
4.6.1 Naranja dulce de Nuevo León.....	49
4.6.2 Limón Persa de Tabasco	52

	Pág.
4.6.3 Limón Persa de Yucatán.....	54
4.6.4 Limón Persa de Tamaulipas y Veracruz	57
V. CONTRIBUCIONES Y RELEVANCIA	60
VI. CONCLUSIONES	62
VII. LITERATURA CITADA.....	63
VIII. APENDICE	
8.1 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide cachexia	74
8.1.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR	74
8.1.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO	76
8.1.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO	77
8.1.4 Características de dilución de los iniciadores	78
8.2 Selección, análisis y dilución de iniciadores para la detección del viroide exocortis.....	80
8.2.1 Selección de iniciadores y simulación de PCR	80
8.2.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO	81
8.2.3 Temperaturas de apareamiento (Tm) estimadas con el programa OLIGO	83
8.2.4 Características de dilución de los iniciadores	84
8.3 Mapa gráfico de restricción de los viroides cachexia y exocortis de los cítricos	86

DEDICATORIA

*A mi esposa,
Teresa Segura Flores*



*A mis hijos,
Omar Marco
Irvin Alejandro*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

*A la memoria de mis padres,
Jose Pablo Alvarado Torres
Ma. del Socorro Gomez de Alvarado*

AGRADECIMIENTOS

A La Facultad de Agronomía de la UANL, por ésta gran oportunidad de superación académica; a su director el Ing. Cesareo Guzmán Flores, por todo su apoyo en la etapa final de mis estudios de Doctorado.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, por su aceptación al Programa de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biotecnología, en especial al Dr. Luis J. Galán Wong, coordinador de este Programa.

A la Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular del Convenio INIFAP-UANL, que mediante sus laboratorios de Virología Vegetal y Patología Molecular, me permitieron la capacitación y realización del trabajo de investigación. Al M.C. Jorge Cantú Vega, Director de Coordinación y Vinculación del INIFAP en el estado de Nuevo León.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por la beca-crédito otorgada para manutención durante el periodo de estudios.

Al Dr. Mario Alberto Rocha Peña, por sus sabias enseñanzas, por todas las facilidades concedidas en su laboratorio y en la red nacional de cítricos del INIFAP que preside, por su comprensión en los errores cometidos y sobre todo por su acertada dirección.

Al Dr. Juan Pablo Martínez Soriano, quién despertara en mí el interés por ésta interesante área del conocimiento, por su ejemplo de dinamismo, y por abrirme las puertas de su laboratorio, de su conocimiento y de su amistad.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez, por sus enseñanzas durante el doctorado y por haber aceptado formar parte del comité de tesis.

Al Dr. Rafael Rivera Bustamante, del CINVESTAV-Unidad Irapuato, por su disponibilidad para colaborar en este proyecto.

Al Dr. Richard F. Lee, de la Universidad de Florida en E.U., por la amable donación de los materiales biológicos y otras facilidades otorgadas.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño y a la Dra. Lilia Hortencia Morales, por aceptar participar como miembros del examen de grado.

Al M.C. Nabor González Garza, por su buena disposición.

Al Dr. Pablo Zapata Benavidez, Dr. Juan Manuel Alcocer, Dra. Diana Sara Leal y M.C. Magdalena Iracheta Cárdenas, por la capacitación, apoyo y sugerencias al trabajo de laboratorio.

A todas aquellas personas como el Ing. Pablo Ruiz Beltrán, M.C. Juan Jasso, M.C. Sergio Silva Vara, y otros, que de manera anónima colaboraron en este proyecto realizando los muestreos en localidades.

A mis compañeros de laboratorio, Alberto Morales, Humberto Almeyda, Ma. Irene Avila, Norma Patricia Cázares, Eleazar Moreno, Leobardo Iracheta, Edgar Gallardo, Elisa María, Olga Isadora, Irma Olivia, Tomás Rangel y Sra. Mirthala Páez.

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto a las siguientes instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Proyecto 4030N

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

Fundación Produce Nuevo León

Fundación Mexicana para la Investigación Científica

BIOGRAFÍA DEL AUTOR



El autor de este trabajo nació en la ciudad de Monterrey el 12 de diciembre de 1961. Está casado con Teresa Segura Flores y tienen 2 hijos: Omar Marco de 7 años e Irvin Alejandro de apenas 1 año. Estudió la carrera de Ingeniero Agrónomo Fitotecnista en la Facultad de Agronomía de la UANL (FAUANL) durante el período comprendido entre los años 1977-1982. De 1983 a 1986 fue Maestro Ordinario y Auxiliar de Investigación en Mejoramiento Genético de Maíz en la FAUANL; posteriormente, de 1986 a 1990 realizó estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Genética en el Centro de Genética del Colegio de Postgraduados ubicado en Montecillo, estado de México. En 1990 se reincorporó a sus actividades de docencia e investigación en la FAUANL hasta 1994, año en que ingresó al Programa de Doctorado en Ciencias en la especialidad de Biotecnología, en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, concluyendo su investigación satisfactoriamente 4 años después.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGIA

AMV	Transcriptasa inversa obtenida del Virus Mieloblastosis Aviar
aprox.	Aproximadamente
cat.	Catálogo
CCaVd	Viroide causante de cachexia en los cítricos
CCaVdc	Forma circular del viroide causante de cachexia en los cítricos
cDNA	Acido desoxirribonucleico complementario
CEGET	Campo Experimental General Terán
CEVd	Viroide causante de exocortis en los cítricos
CEVdc	Forma circular del viroide causante de exocortis en los cítricos
CF-11	Celulosa
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
Comp.	Complementario
cRNA	RNA complementario
cv	Cultivar
DEPC	Diethyl pirocarbonato
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxinucleósidos trifosfatados
dPAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizante
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
E.U.	Estados Unidos de América
FAO	Organización para la Alimentación y la Agricultura
Fig.	Figura
g	Gramos
GPS	Solución amortiguadora a base de glicina, fosfato de sodio y cloruro de sodio
ha	Hectáreas
Hinf I	Enzima que reconoce la secuencia 5'-G↓ANTC
Homó.	Homólogo
IBPGR	Consejo Internacional para los Recursos Genéticos Vegetales
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias
JA-20	Modelo del rotor para centrifuga
kcal	Kilocalorías
km	Kilómetro
M	Concentración molar o molaridad
m	Marcador de peso molecular
mA	Miliamperios
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Concentración milimolar
mm	Milímetros
M-MLV	Transcriptasa inversa obtenida del Virus de la Leucemia Murina de Moloney
Na ₂ EDTA	Acido etilendiaminotetracético, sal disódica
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramos
N.L.	Nuevo León
nm	Nanómetros
nM	Concentración nanomolar
nmoles	Nanomoles
No.	Número
Pág.	Página
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pg	Picogramos
pH	Potencial hidrógeno
PM	Peso molecular
pmoles	Picomoles
repe	Repetición
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SLS	Sarcosina lauril de sodio
sPAGE	Electroforesis secuencial
STE	Solución amortiguadora a base de tris, cloruro de sodio y Na ₂ EDTA
TAE	Solución amortiguadora a base de tris, acetato de sodio y Na ₂ EDTA
Taq	Enzima termoestable que polimeriza DNA, proviene de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Solución amortiguadora a base de tris, ácido bórico y Na ₂ EDTA
T _m	Temperatura de apareamiento
Tris	TRIZMA® Base. Tris[Hidroximetil]aminometano
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UDO	Unidades de densidad óptica
USA	Estados Unidos de América, siglas en idioma inglés
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VTC	Virus Tristeza de los Cítricos
v/v	Volumen/volumen
X	Número de veces con respecto a la concentración original
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
°C	Grados Celsius
%	Por ciento (medida de cantidad)
'	Minutos (medida de tiempo)
''	Segundos (medida de tiempo)
4S, 5S, 7S, 18S, 28S	Acidos ribonucleicos ribosomales con coeficientes de sedimentación 4, 5, 7, 18 y 28
1a.	Primera
2a.	Segunda

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

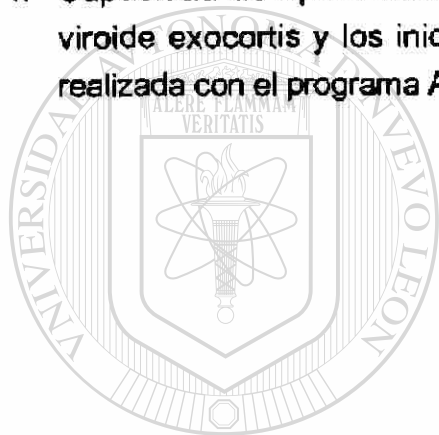


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE CUADROS

No.	Descripción	Pág.
1.	Descubrimiento cronológico de viroides	4
2.	Variantes conocidas del viroide exocortis de los cítricos	7
3.	Variantes conocidas del viroide enanismo del lúpulo	8
4.	Catálogo consenso de viroides de cítricos	9
5.	Transmisión e intensidad sintomatológica de viroides de cítricos en especies herbáceas	10
6.	Especies vegetales utilizadas para la detección y transmisión de RNAs patogénicos de plantas	16
7.	Colectas de limón Persa y naranjo dulce efectuadas en diferentes localidades	17
8.	Soluciones necesarias para la preparación de geles nativos de poliacrilamida al 5% (A) y al 7% desnaturizante con urea 8 M (B) dependiente del volumen a utilizar	24
9.	Rendimiento estimado del RNA total ($\mu\text{g g}^{-1}$) extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos	32
10.	Relación de absorbancias 260/280 nm obtenidas en RNA extraído de corteza y hojas de cítricos por 5 métodos	34
11.	Transmisión de viroides a diferentes especies vegetales a partir de RNA total, RNA viroidal y yemas de limón Persa	49

No.	Descripción	Pág.
12.	Detección de viroides por sPAGE y RT-PCR a partir de RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas y Veracruz	57
13.	Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide cachexia y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify	75
14.	Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide exocortis y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify	81



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

No.	Descripción	Pág.
1.	Esquema general del procedimiento realizado para la implementación y validación de técnicas moleculares de detección de viroides en cítricos	15
2.	Esquema con las características de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5% (1a. dirección)	25
3.	Esquema con las características de la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes con urea 8 M (2a. dirección)	26
4.	RNA obtenido por 5 métodos de extracción a partir de corteza de cidra Etrog visualizado en un gel de agarosa al 0.8%	35
5.	Electroforesis secuencial en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M) con aislamientos de viroides semipurificados	38
6.	Comparación de 5 métodos de extracción del RNA en la sensibilidad de detección del viroide exocortis en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M)	40
7.	Amplificación del cDNA del viroide cachexia visualizado en un gel de agarosa al 1.3%	43
8.	Amplificación del cDNA del viroide cachexia sintetizado a partir de diferentes concentraciones de RNA y visualizado en un gel de poliacrilamida al 5%	44
9.	Reacción de hibridación para el viroide tubérculo fusiforme de la papa con RNA extraído de cidra Etrog por 5 métodos	46

No.	Descripción	Pág.
10.	Separación en un gel de agarosa al 0.8% del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce de un lote de variedades tempranas del CEGET, N.L.	49
11.	Separación del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce en un gel de poliacrilamida nativo al 5%	50
12.	Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de árboles de naranjo dulce del lote de variedades tempranas colectadas en el CEGET, N.L.	51
13.	Productos de PCR obtenidos con iniciadores específicos para exocortis en 7 muestras de naranjo dulce	52
14.	Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	53
15.	Amplificación enzimática con iniciadores específicos para exocortis del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	53
16.	Amplificación enzimática con iniciadores específicos para cachexia del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco	54
17.	Electroforesis secuencial del RNA extraído de 5 muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán	55
18.	Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis y cachexia en muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán	55
19.	Electroforesis secuencial del RNA extraído de 8 muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán	56

No.	Descripción	Pág.
20.	Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis (A) y cachexia (B) en muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán	56
21.	Síntomas asociados con infección por viroides en limón Persa y pepino	59
22.	Simulación de amplificación por PCR del viroide cachexia utilizando la accesión U02527 como secuencia molde, los iniciadores HSV y el programa Amplify	74
23.	Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide cachexia	79
24.	Simulación de amplificación por PCR del viroide exocortis utilizando la accesión U21126 como secuencia molde, los iniciadores CEV y el programa Amplify	80
25.	Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide exocortis	85
26.	Mapa gráfico de restricción del viroide cachexia simulado con el programa DNA Strider	86
27.	Mapa gráfico de restricción del viroide exocortis simulado con el programa DNA Strider	86

RESUMEN

El diagnóstico rutinario de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos se ha realizado en México mediante bioensayos en plantas indicadoras, cidra Etrog para exocortis y mandarina Parson's Special para cachexia; sin embargo, este método de detección es lento y requiere condiciones estrictas de temperatura así como amplio espacio en invernaderos. Debido a la necesidad de tener métodos rápidos y sensibles para determinar la sanidad de los árboles, se planteó el presente trabajo con el objetivo general de implementar metodologías moleculares para la detección de viroides, y su aplicación en la identificación de los viroides causantes de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos. Después de probar diferentes factores involucrados en la separación y tinción del RNA en geles de poliacrilamida, se estableció la técnica de electroforesis secuencial (sPAGE) para la detección de los viroides exocortis (CEVd) y cachexia (CCaVd). Al comparar 5 métodos de extracción del RNA para la detección directa del viroide exocortis por sPAGE, no se encontró diferencia entre éstos, lográndose resultados satisfactorios con los 5 métodos probados; sin embargo, el método de Lee (1995) mostró superioridad en la cantidad de RNA total obtenido. Por otra parte, se establecieron las condiciones de reacción para la amplificación del DNA complementario a las secuencias de los viroides exocortis y cachexia a partir de testigos semipurificados y RNA extraído de plantas indicadoras. Se obtuvieron mejores resultados con un proceso de RT-PCR desacoplado o discontinuo obteniéndose un producto de 300 pb aproximadamente y una sensibilidad de 100 ng de RNA total en el caso de CCaVd; y un producto de 370 pb en el caso de CEVd. En ambos casos no se observó amplificación con RNA extraído de testigos sanos. Se validaron las técnicas sPAGE y RT-PCR con muestras de huertos comerciales de limón Persa colectadas en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán, así como un lote de variedades de naranja dulce en el estado de Nuevo León, lográndose la detección de ambos viroides (CEVd y CCaVd) por RT-PCR en plantas de limón Persa con diferentes niveles de síntomas, pero por sPAGE sólo fue posible detectar CEVd en las mismas muestras. Los viroides CEVd y CCaVd detectados en naranja dulce y limón Persa fueron transmitidos a tomate, pepino, naranja agrio, naranja dulce Pineapple, mandarina Cleopatra, citrange Troyer y cidra Etrog, comprobándose la infectividad de dichos patógenos. Los resultados obtenidos indican que las 2 técnicas establecidas (sPAGE y RT-PCR) son complementarias para la detección efectiva y segura de los viroides CEVd y CCaVd.

ABSTRACT

In Mexico, the current method for diagnosing citrus exocortis and cachexia diseases is by reactions on indexing hosts, Etrog citron for exocortis and Parson's Special mandarin for cachexia. However, this method of detection is slow and require strict control of temperature and space in greenhouse. Due necessity in to have speed and sensitive methods for tree health determination, the general objective of this work was implementing molecular methods for viroids detection and its application to identifying the viroids causing citrus exocortis and cachexia diseases. After trying different factors affecting RNA separation and polyacrylamide gels staining, the sequential polyacrylamide gels electrophoresis technique (sPAGE) for detection of exocortis (CEVd) and cachexia viroids (CCaVd) was established. After comparing five methods of RNA isolation for direct detection of exocortis viroid by sPAGE, there were no differences between those. Satisfactories results had obtained with all five testing methods, however, Lee (1995) method overcome the others in quantity of total RNA. Otherwise, reaction conditions for the amplification of complemetary DNA to sequences of the exocortis and cachexia viroids were established from semipurified controls and RNA getting from indicator plants. Better results were obtained with a disacoupled process of RT-PCR obtaining a 300 base pair (bp) fragment and a sensitivity of 100 ng of total RNA in the case of CCaVd, and a 370 bp fragment with CEVd. In both cases no amplification signs were observed when using RNA isolated from healthy controls. In the validity tests of sPAGE and RT-PCR techinques with Persian lime samples from field trees collected in Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, and Yucatán states, and an orchard of orange cultivars in Nuevo León, both viroids (CEVd and CCaVd) were found by RT-PCR in Persian lime in most of the samples with different levels of symptoms, but only CEVd was detected in the same samples by sPAGE. CEVd and CCaVd viroids from sweet orange and Persian lime were transsmited to tomato, cucumber, sour orange, sweet orange Pineapple, Cleopatra mandarin, Troyer citrange, and Etrog citron, for verifying the infectivity of pathogens. The results obtained suggests that both techinques (sPAGE and RT-PCR) are necessary for certain and reliable detection of CEVd and CCaVd.

I. INTRODUCCION

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

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

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

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

1.1 Hipótesis

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

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

1.2 Objetivos

i) Implementación de la técnica electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) para la detección directa de viroides.

ii) Comparación de 5 métodos de extracción del RNA para la detección de viroides en cítricos.

iii) Establecimiento y optimización del método de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para amplificar el DNA complementario (cDNA) al RNA viroidal causante de las enfermedades exocortis y cachexia de los cítricos.

iv) Validación de las técnicas sPAGE y RT-PCR en plantas con infección natural de campo.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Identidad de los viroides

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

2.2 Ocurrencia, distribución e importancia en la agricultura

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

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

Cuadro 1. Descubrimiento cronológico de viroides.

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

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

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

2.3 Caracterización

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

2.4 Viroides causantes de enfermedades en cítricos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5 Extracción del RNA

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

2.6 Detección de viroides

Existen varios métodos para la detección de agentes infecciosos en material de propagación de cítricos, entre los que se pueden citar el ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA), electroforesis secuencial (sPAGE), aislamiento de procariotes en medio de cultivo (bacterias, espiroplasmas, etc), análisis de RNA de doble cadena, microscopía electrónica de inmunoadsorción y la hibridación con ácidos nucleicos (FAO-IBPGR, 1991; Roistacher, 1991); sin embargo, para el caso de viroides se aplican el uso de plantas indicadoras (Roistacher, 1991), el análisis electroforético en geles de poli(acrilamida) (Baksh y cols., 1984; Boccoardo y cols., 1984; Duran-Vila y cols., 1988a, 1988b; Gillings y cols., 1986; Semancik y cols., 1988a, 1988b), y más recientemente la

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

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

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

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

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

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

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

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

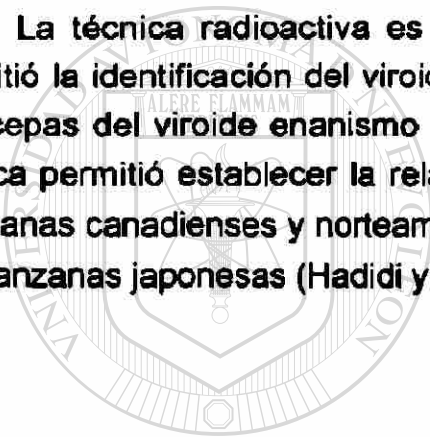
Mediante una transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) ha sido posible la detección de viroides causantes del cicatrizado de la piel de la manzana (ASSVd), el PSTVd y el HSVd entre otros (Hadidi y Yang, 1990; Yang y cols., 1992). Un aspecto clave es el diseño de iniciadores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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. MATERIALES Y METODOS

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

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

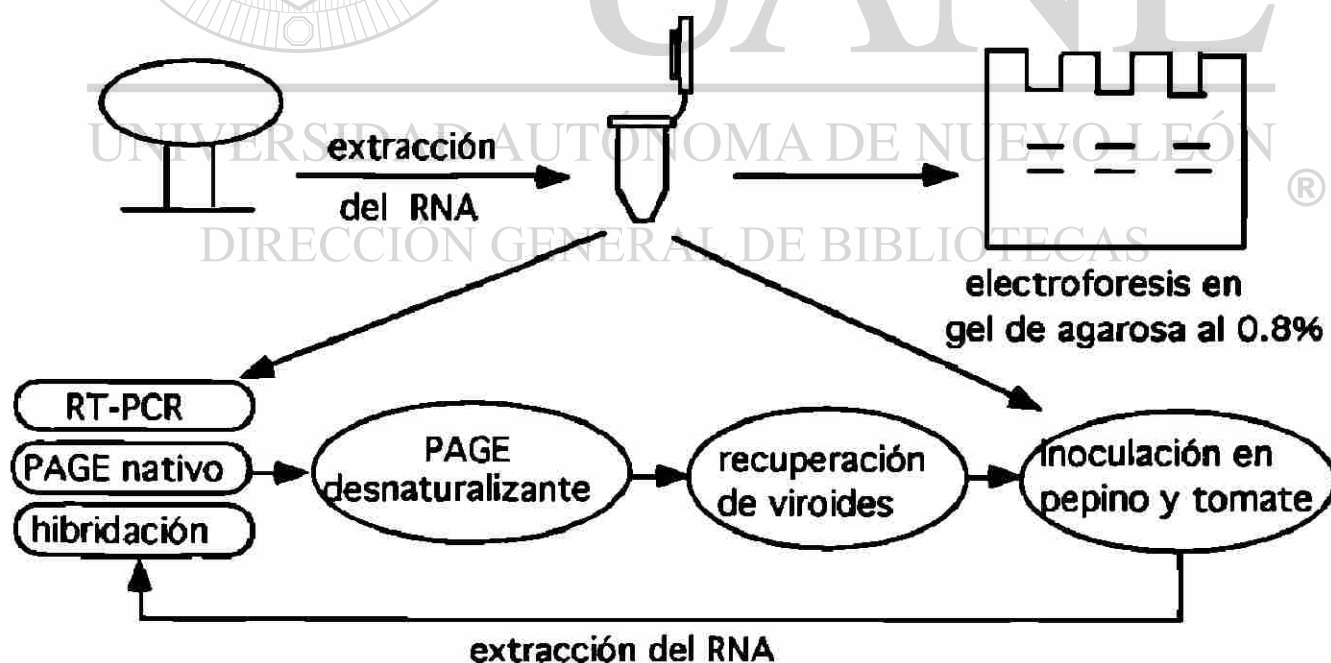


Fig. 1. Esquema general del procedimiento realizado para la implementación y validación de técnicas moleculares de detección de viroides en cítricos.

3.1 Fuente de viroides y material vegetal

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

3.2 Extracción del RNA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

de tal forma que:

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

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

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

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

3.3 Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida

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

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

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

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

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

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

(A)

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

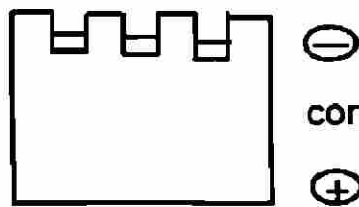
(B)

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

Se disuelve la urea con calor suave y agitación

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

muestras y colorante



Composición del gel: agua
TAE 10X pH 7.2
poliacrilamida al 30%
temed
persulfato de amonio 10%
Solución de corrimiento: TAE 1X

tiempo: 2.5 horas

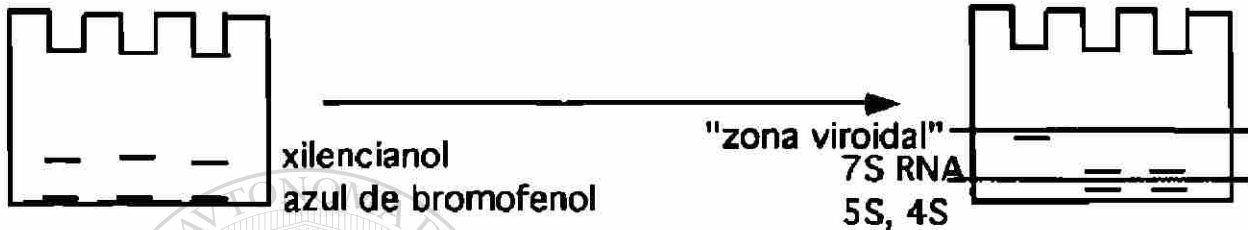
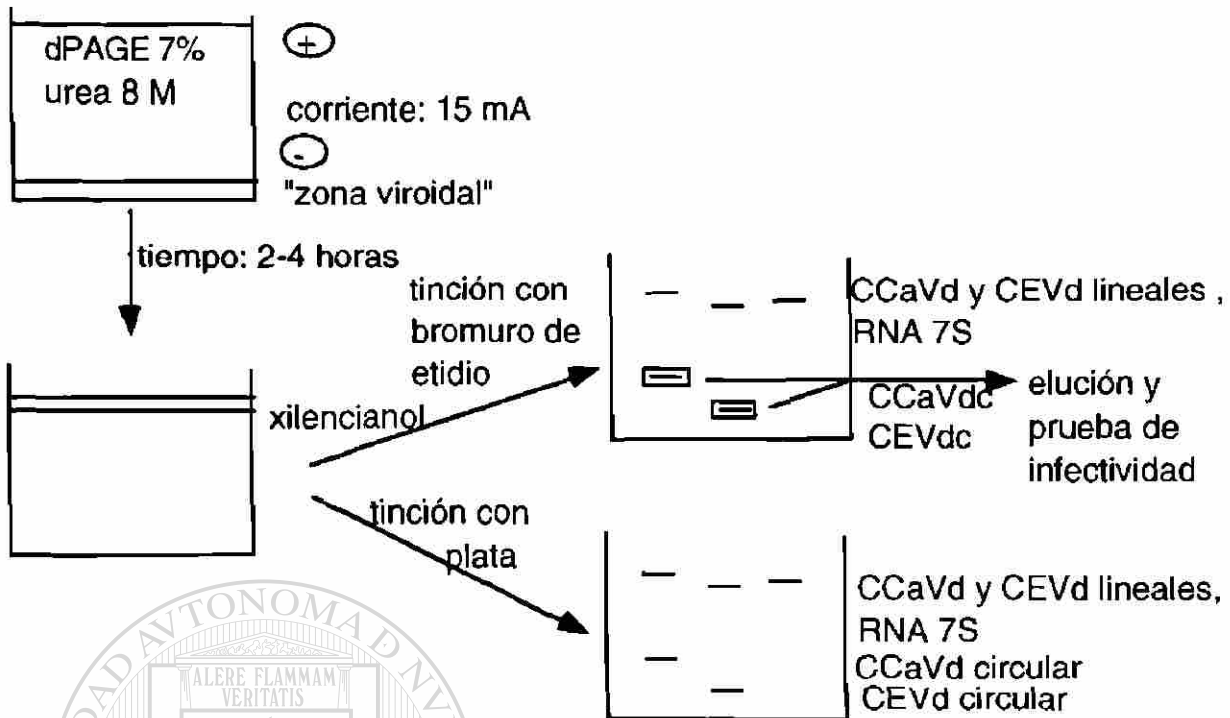


Fig. 2. Esquema con las características de la electroforesis en geles nativos de poliacrilamida al 5% (1a. dirección) .

PAGE al 7% desnaturizante con urea 8 M. Una vez ensamblados los cristales y con un fragmento del gel nativo en la parte inferior, se procedió a mezclar en un vaso de precipitado las cantidades señaladas en el Cuadro 8B, se agitó la solución en una plancha magnética con calor, y una vez disuelta la urea se agregó la solución de poliacrilamida al 30%, el temed y el persulfato de amonio al 10%. Se vertió rápidamente la solución en las placas de cristal y se dejó polimerizar durante 1 hora. Se rellenaron los reservorios de la cámara electroforética con solución amortiguadora TBE 1X (Tris 22.5 mM, ácido bórico 22.5 mM y Na₂EDTA 0.5 mM) pH 8.3 y se invirtieron los electrodos aplicando corriente constante de 15 mA hasta que el xilencianol migró 1 cm abajo de la parte superior (4 horas 15 min en la cámara acrílica y 2 horas en la 'Mighty Small II'). Finalmente se removió el gel de los cristales y se tiñó (Fig. 3).



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

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

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

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

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

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

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

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

3.4 Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.6 Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



IV. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Extracción del RNA

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

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

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

¹Corteza de cidra

²Corteza de cidra

³Hojas de cidra

⁴Corteza de limón Persa

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

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

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

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

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

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

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

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

¹Corteza de cidra

²Corteza de cidra

³Hojas de cidra

⁴Corteza de limón Persa

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

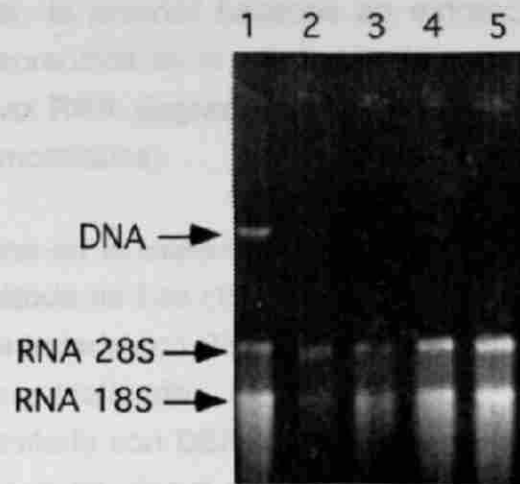


Fig. 4. RNA obtenido por 5 métodos de extracción a partir de corteza de cidra Etrog visualizado en un gel de agarosa al 0.8%. Cantidad de RNA aplicada por carril y por método: 1. 600 ng de RNA, Yang y cols. (1992); 2. 348 ng, Chomczynski y Sacchi (1987); 3. 1084 ng, Pfannenstiel y cols. (1980); 4. 1080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

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

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

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

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

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

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

4.2 Análisis del RNA por electroforesis en geles de poliacrilamida

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

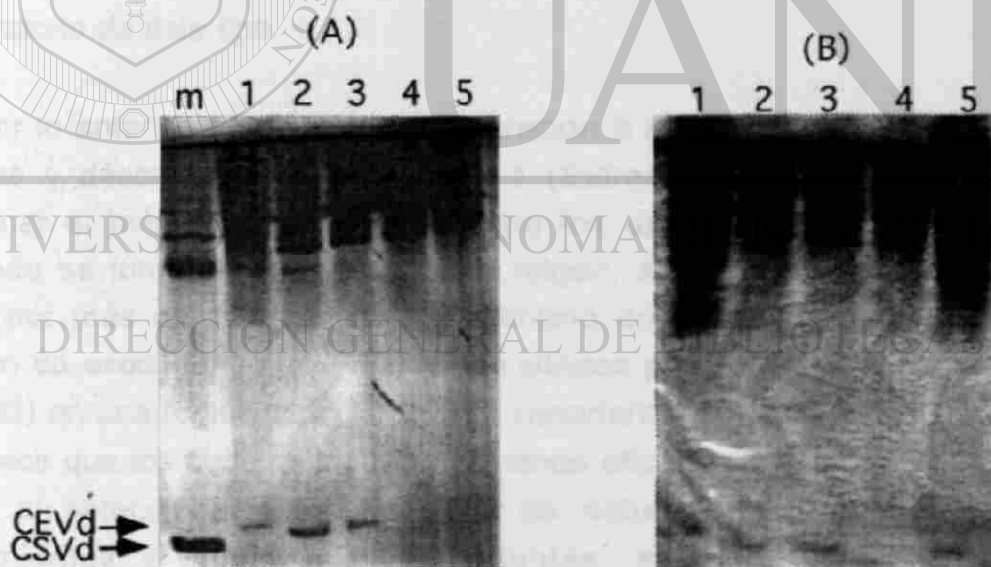


Fig. 6. Comparación de 5 métodos de extracción del RNA en la sensibilidad de detección del viroide exocortis en un gel de poliacrilamida al 7% desnaturalizante (urea 8 M) cargado con 15 μ g de RNA obtenido de muestras de hoja (A), y 10 μ g de RNA de corteza (B) de cidra Etrog previamente inoculada. m,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

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

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

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

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

4.3 RT-PCR

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

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

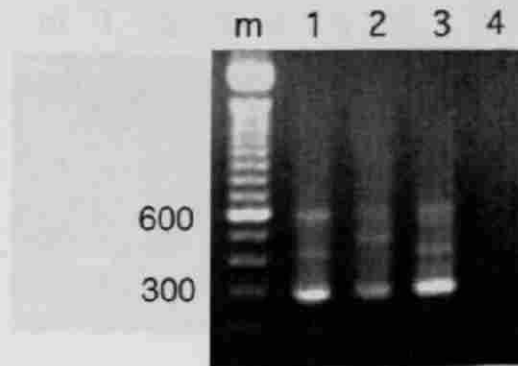


Fig. 7. Amplificación del cDNA del viroide cachexia visualizado en un gel de agarosa al 1.3%. m. Marcador de peso molecular, 1. RNA de mandarino Parson's Special, 2. xylo-902, 3. xylo-82DR, 4. control sin cDNA.

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

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



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

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

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

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

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

4.4 Hibridación molecular

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

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

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



Claves de interpretación:

POS, mancha muy intensa, resultado positivo definitivo

PwS, mancha fácilmente visible, resultado positivo

PvS, mancha débil, resultado positivo probable

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

NEG, negativo

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

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

4.5 Transmisión de viroides y pruebas de patogenicidad

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

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

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

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

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

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

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

4.6 Validación integrada de técnicas moleculares en diversos hospedantes

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

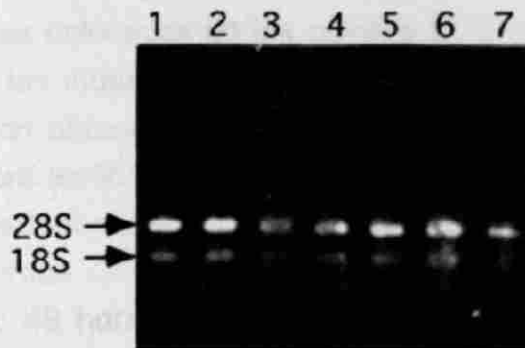


Fig. 10. Separación en un gel de agarosa al 0.8% del RNA obtenido de muestras de naranja dulce de un lote de variedades tempranas del CEGET, N.L. Se cargó con 1 μg de RNA por carril. Los números de los carriles indican variedades de naranja.

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

Fig. 12. Electroforesis en urea del RNA de los frutos de naranjo dulce en muestras de variedades de naranjo dulce de la Universidad Autónoma de Nuevo León en el CROET

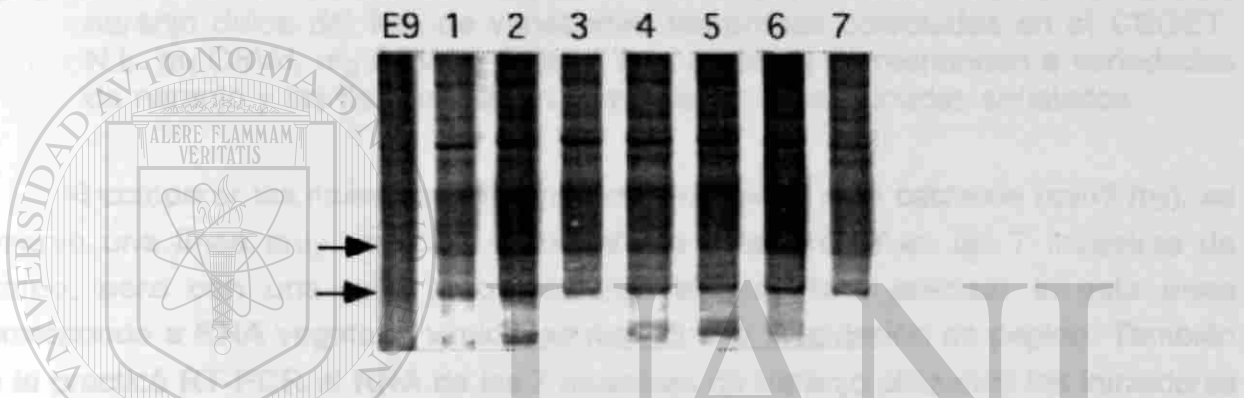


Fig. 11. Separación del RNA obtenido de muestras de naranjo dulce en un gel de poliacrilamida nativo al 5%. E9 testigo con exocortis. Los números corresponden a variedades de naranjo. Las flechas delimitan la región de movilidad probable de los viroides. Se cargó con 2 μg de RNA total por carril.

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

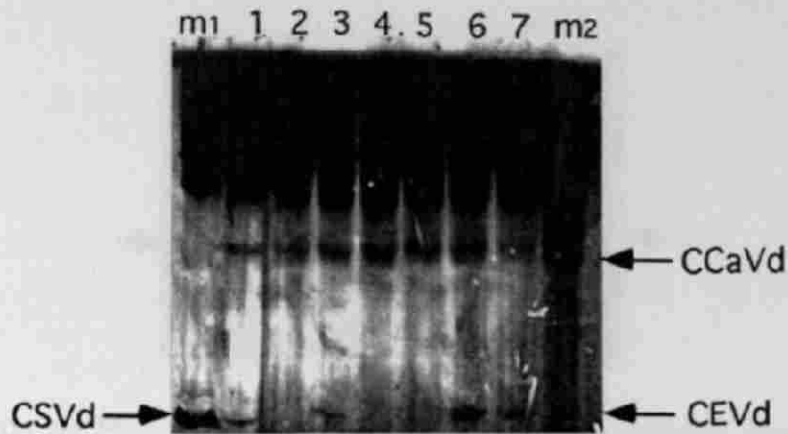


Fig. 13. Prueba

Fig. 12. Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de árboles de naranjo dulce del lote de variedades tempranas colectadas en el CEGET, N.L. m₁ CSVd, m₂ CEVd y CCaVd. Los números corresponden a variedades de naranjo y las flechas indican la movilidad de los viroides señalados.

Al comparar las muestras de campo con el testigo para cachexia (carril m₂), se observó una línea muy parecida en tamaño a este viroide en las 7 muestras de campo, pero con una talla aprox. de 295 bases. Para precisar si esta línea corresponde a RNA vegetal o viroidal se realizó una inoculación en pepino. También se le practicó RT-PCR al RNA de las 7 muestras de naranjo utilizando los iniciadores específicos para cachexia. Las plantas de pepino inoculadas no mostraron reacción alguna a la introducción del RNA, y las reacciones de RT-PCR no produjeron ninguna amplificación por lo que se concluyó que la banda estudiada no corresponde al viroide cachexia. Por la talla molecular estimada existe la posibilidad de que dicha banda corresponda al viroide III de los cítricos el cual contiene 294 y 297 bases (Rakowski y cols., 1994; Stasys y cols., 1995); sin embargo esto parece poco probable considerando que dicha banda se observó en las 7 muestras y además no se presentó en las muestras de los árboles de las repeticiones II, III y IV del mismo lote.

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



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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

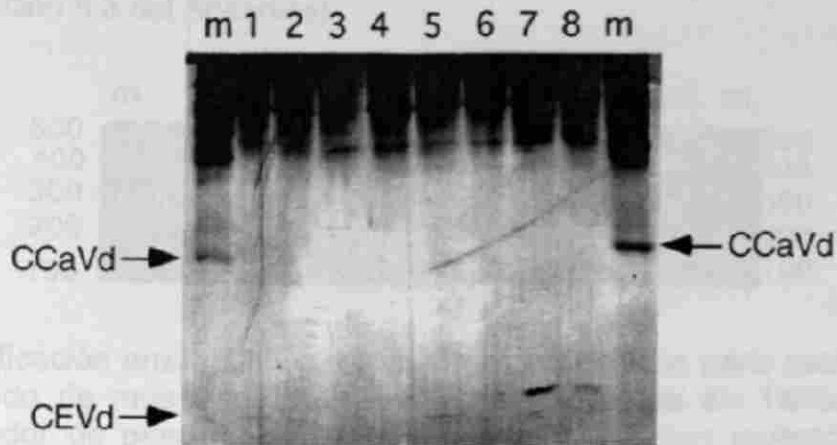


Fig. 14. Electroforesis secuencial del RNA extraído a partir de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco. m muestra control que contiene los viroides exocortis y cachexia. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7 y 8 con deterioro acentuado.

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



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

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

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

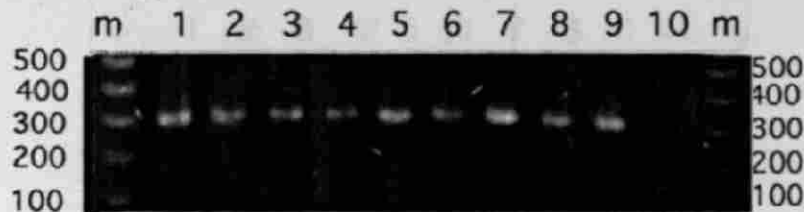


Fig. 16. Amplificación enzimática con iniciadores específicos para cachexia del RNA obtenido de muestras de limón Persa colectadas en Tabasco. m es un marcador de peso molecular. Carriles 1, 2 y 3 son muestras de árboles vigorosos; 4, 5 y 6 con deterioro moderado; 7, 8 y 9 con deterioro acentuado; 10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

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

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

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

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

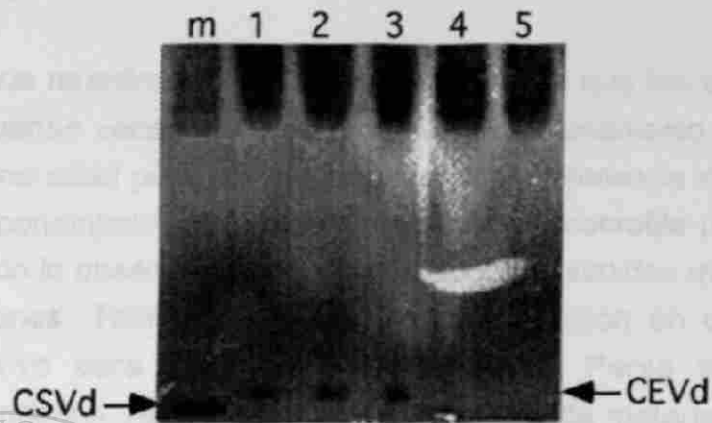


Fig. 17. Electroforesis secuencial del RNA extraído de 5 muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán. m es CSVd.

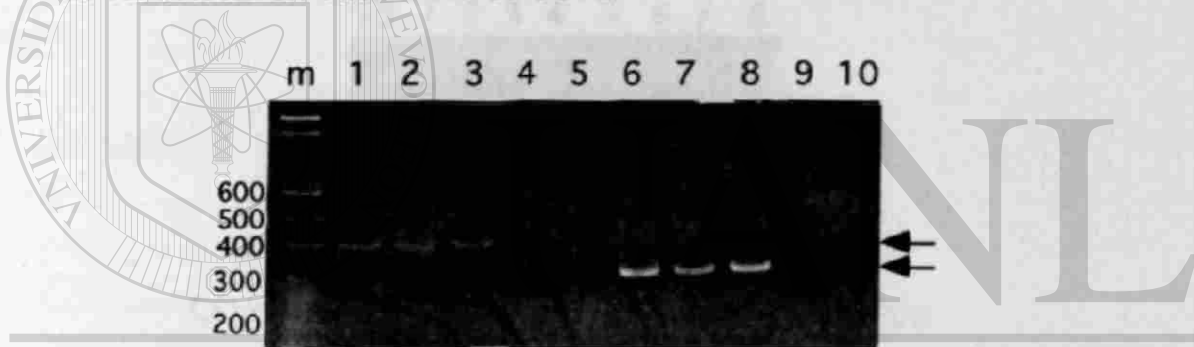


Fig. 18. Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis (carriles 1, 2, 3, 4 y 5) y cachexia (6, 7, 8, 9 y 10) en muestras de limón Persa de la 1a. colecta en Yucatán. m es un marcador de peso molecular. Las flechas señalan los fragmentos amplificados de 370 y 300 pb respectivamente.

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

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

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

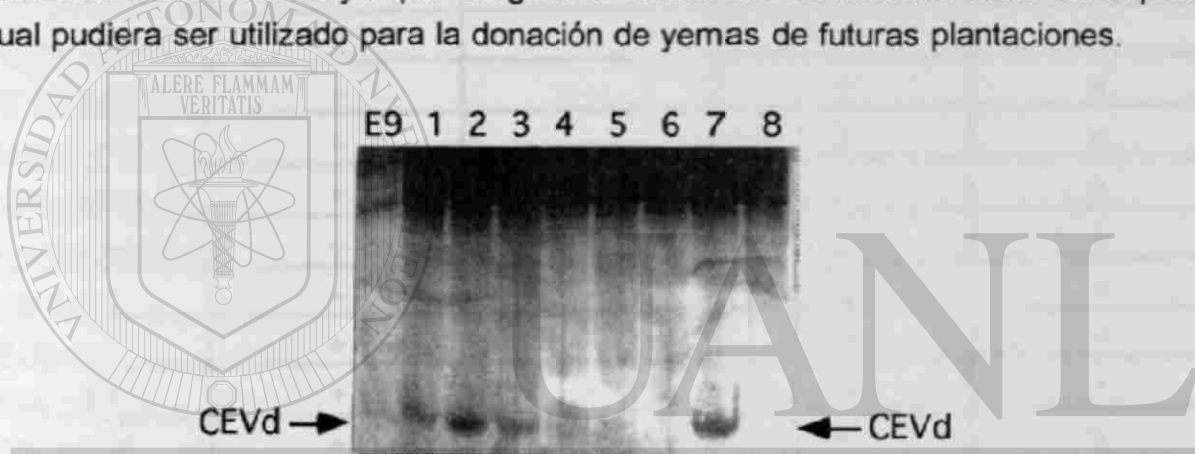


Fig. 19. Electroforesis secuencial del RNA extraído de 8 muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán. Los números indican las muestras colocadas.

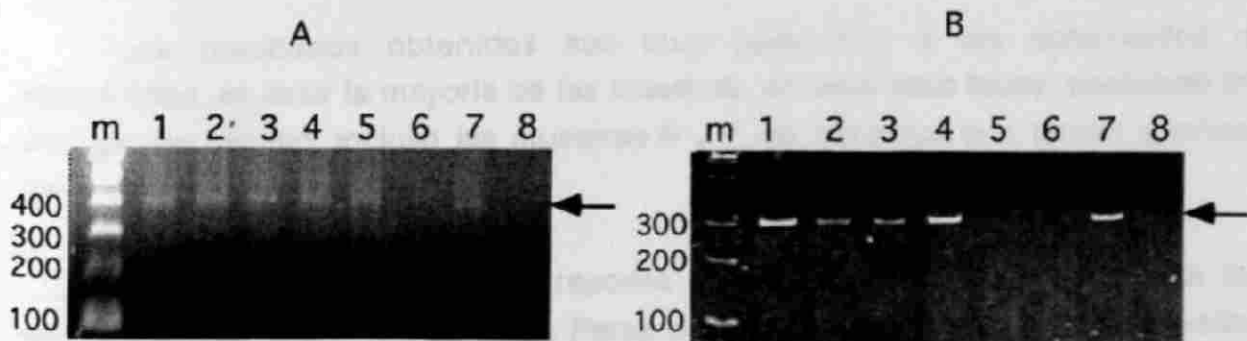


Fig. 20. Amplificación enzimática del cDNA de los viroides exocortis (A) y cachexia (B) en muestras de limón Persa de la 2a. colecta en Yucatán. m es un marcador de peso molecular. Las flechas indican productos de 370 y 300 pb aprox.

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

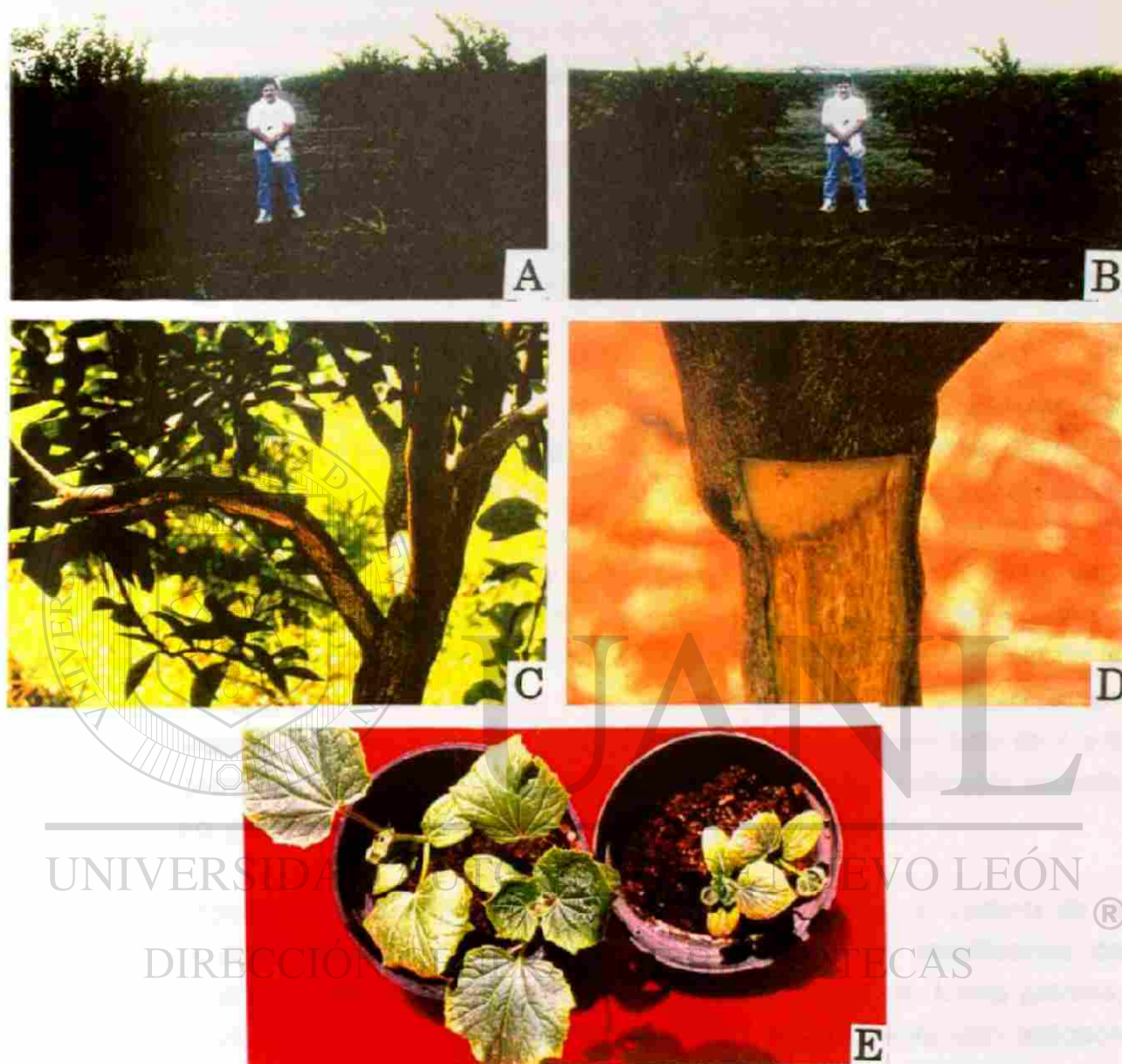


Fig. 21. Síntomas asociados con la ocurrencia de viroides en limón Persa y pepino. **A.** Árboles de 2 años de edad injertados con yemas de limón Persa sano sobre limón macrofila (*C. macrophylla*). **B.** Árboles infectados con una mezcla de los viroides exocortis y cachexia en una plantación comercial.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

V. CONTRIBUCIONES Y RELEVANCIA

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

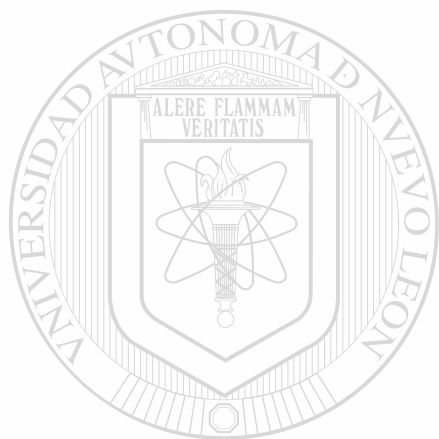
Con este trabajo se puede asegurar el éxito en la extracción de RNA vegetal y viroidal, siguiendo el protocolo de cualquiera de los 5 métodos evaluados. También se logró la implementación y optimización de la técnica electroforesis secuencial, que aunque fue originalmente establecida hace 14 años (Semancik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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. CONCLUSIONES

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

1. Es factible la detección rápida y precisa de los viroides exocortis y cachexia en muestras de cítricos, utilizando en forma complementaria las técnicas de electroforesis secuencial (sPAGE) y transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).
2. Se logró la implementación de la técnica electroforesis secuencial con viroides testigos, permitiendo además la detección del viroide exocortis en RNA extraído de muestras de árboles de campo de naranjo dulce y limón Persa, sin embargo, la técnica no fue lo suficientemente sensible para detectar al viroide cachexia.
3. Los 5 métodos de extracción de RNA evaluados fueron efectivos en la obtención de RNA en buena cantidad y calidad, necesario para la detección de viroides por sPAGE y RT-PCR.
4. Es posible amplificar por RT-PCR al DNA complementario del RNA de los viroides exocortis y cachexia aislado de pepino, tomate, cidra Etrog, mandarinos Parson's Special y Cleopatra, naranjo agrio, naranjo dulce y citrange Troyer.
5. Las técnicas establecidas de sPAGE y RT-PCR son reproducibles y pueden ser aplicadas en la detección de los viroides exocortis y cachexia de los cítricos a partir de árboles de campo de naranjo dulce y limón Persa.
6. El agrietamiento de la corteza del tallo principal y ramas laterales así como el enanismo de limón Persa se deben al menos a la ocurrencia de los viroides exocortis y cachexia.
7. Los viroides exocortis y cachexia de los cítricos pueden ser transmitidos y replicados por las plantas herbáceas pepino y tomate, así como por las plantas leñosas cidra Etrog, mandarino Cleopatra, naranjo agrio, naranjo dulce Pineapple y citrange Troyer.

VII. LITERATURA CITADA

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

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

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

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

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

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

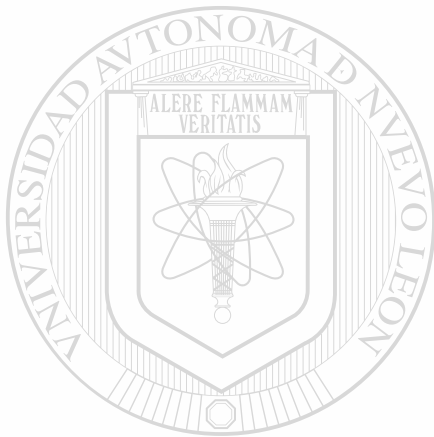
- Rakowski, A.G., Szychowski, J.A., Avena, Z.S., and Semancik, J.S. 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 75:3581-3584.
- Randles, J.W. 1975. Association of two ribonucleic acid species with cadang-cadang disease of coconut palm. *Phytopathology*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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VIII. APENDICE

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

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

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

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

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

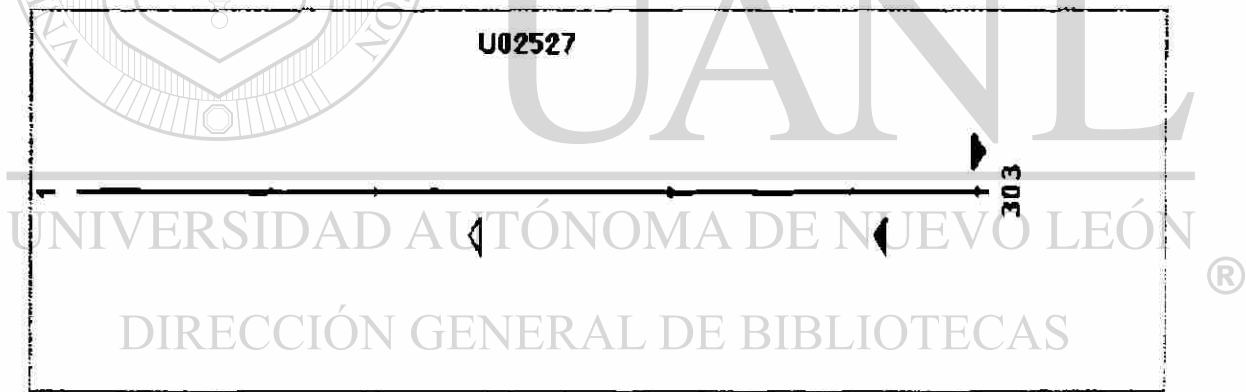


Fig. 22. Simulación de amplificación por PCR del viroide cachexia utilizando la accesión U02527 como secuencia molde, los iniciadores HSV y el programa Amplify.

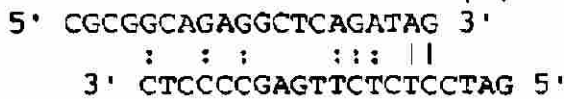
Cuadro 13. Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide cachexia y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify. comp. significa complementario y homó. homólogo.

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

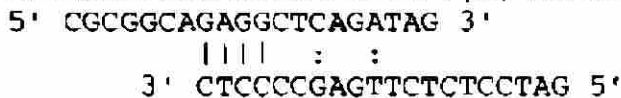
8.1.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO.

Formación de dímeros entre los iniciadores complementario/homólogo:

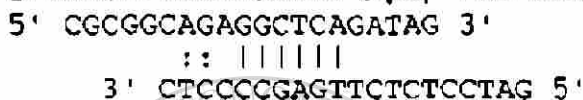
El dímero más estable en 3': 2 pb, -1.6 kcal/mol



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



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



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

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

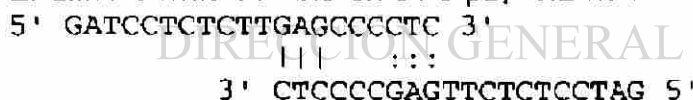


El dímero más estable: 4 pb, -10.3 kcal/mol

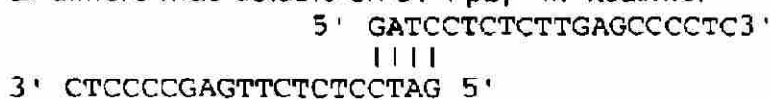


Formación de duplex con el iniciador HSV-homólogo (posición del oligo = 1):

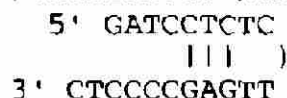
El dímero más estable en 3': 3 pb, -3.2 kcal/mol



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



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



8.1.3 Temperaturas de apareamiento (T_m) estimadas con el programa OLIGO

HSVd-complementario

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

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

DNA Melting Temperature in Various Salt and Formamide Concentrations (°C)

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

Approximate T_m of the mismatched oligo:

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

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

HSVd-homólogo

Lower Primer, 20-mer [1]:

Td = 64.3° [nearest neighbor method]

Tm = 72.3° [%GC method]

Tm = 64° [2°*(A+T) + 4°*(G+C) method]

Mr = 6060 k [one strand]

Mr = 12.4 k [two strands]

µg/OD = 46.1 [dsDNA]

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

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

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

Approximate Tm of the mismatched oligo:

Tm = Td - 1.2*(% mismatch)

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

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

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

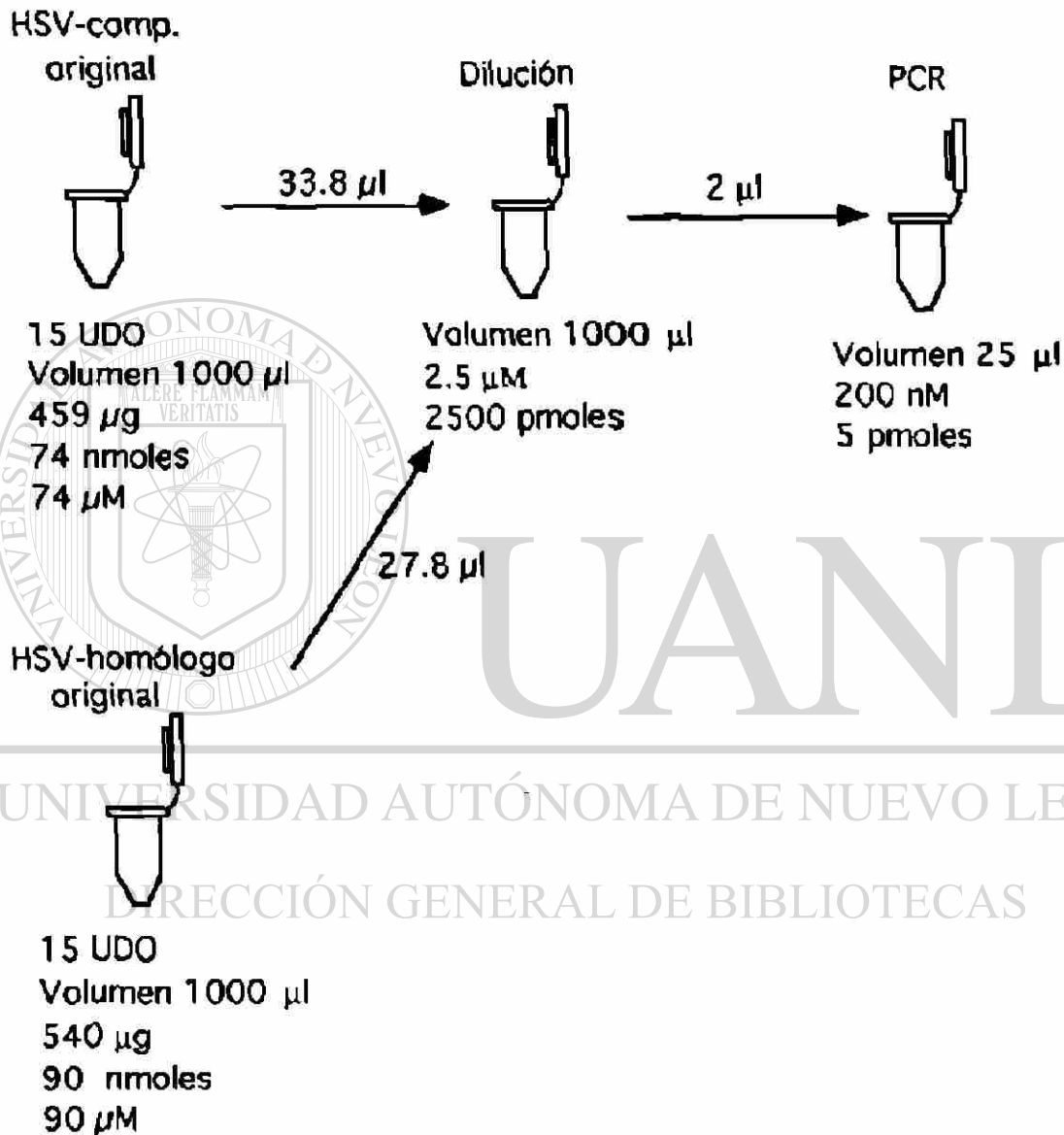


Fig. 23. Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide cachexia.

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

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

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

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

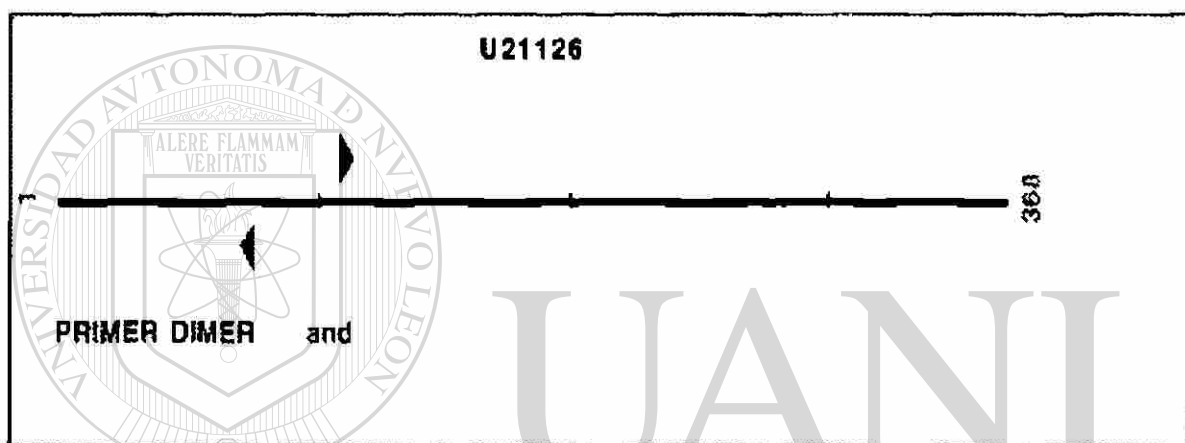


Fig. 24. Simulación de amplificación por PCR del viroide exocortis utilizando la accesión U21126 como secuencia molde, los iniciadores CEV y el programa Amplify.

Dímeros entre iniciadores, calidad = 4

```

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

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

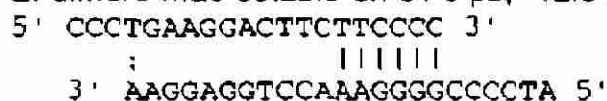
Cuadro 14. Capacidad de apareamiento estimada entre diferentes variantes del viroide exocortis y los iniciadores seleccionados según la simulación realizada con el programa Amplify. comp. significa complementario y homó. homólogo.

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

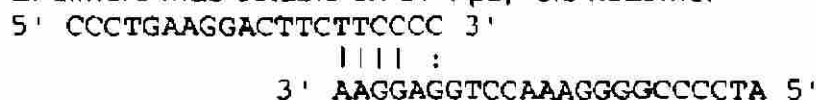
8.2.2 Formación de dímeros, duplex y 'hairpin' según el programa OLIGO.

Dímeros entre los iniciadores CEV-complementario y CEV-homólogo

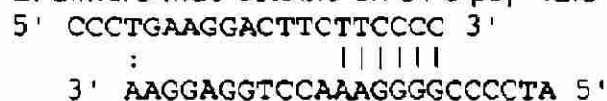
El dímero más estable en 3': 6 pb, -12.8 kcal/mol



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

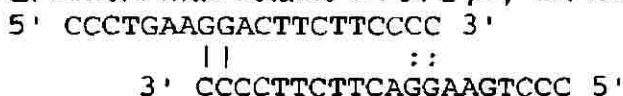


El dímero más estable en 3': 6 pb, -12.8 kcal/mol

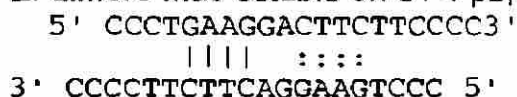


Formación de duplex con el iniciador CEV-complementario

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



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



Formación de duplex con el iniciador CEV-homólogo

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

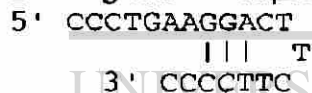


Formación de 'hairpin' con el iniciador CEV-complementario

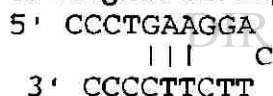
1. Longitud del duplex = 4 pb; $\Delta G = -0.7$ kcal/mol; Lazo= 5 nucleótidos



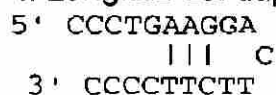
2. Longitud del duplex = 3 pb; $\Delta G = -0.3$ kcal/mol; Lazo= 5 nucleótidos



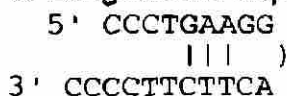
3. Longitud del duplex = 3 pb; $\Delta G = 0.6$ kcal/mol; Lazo= 7 nucleótidos



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



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



Formación de 'hairpin' con el iniciador CEV-homólogo

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

5' ATCCCC
 (((()

3' AAGGAGGTCCAAAGGGG

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

5' ATCCCCGGGG
 ((()

3' AAGGAGGTCCAAA

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

5' ATCCCCGGGGGA
 (((A

3' AAGGAGGTCCA

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

Iniciador CEV-complementario, 20-bases:

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

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

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

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

Approximate Tm of the mismatched oligo:

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

Iniciador CEV-homólogo, 23-bases:

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

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

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

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

Approximate Tm of the mismatched oligo:

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

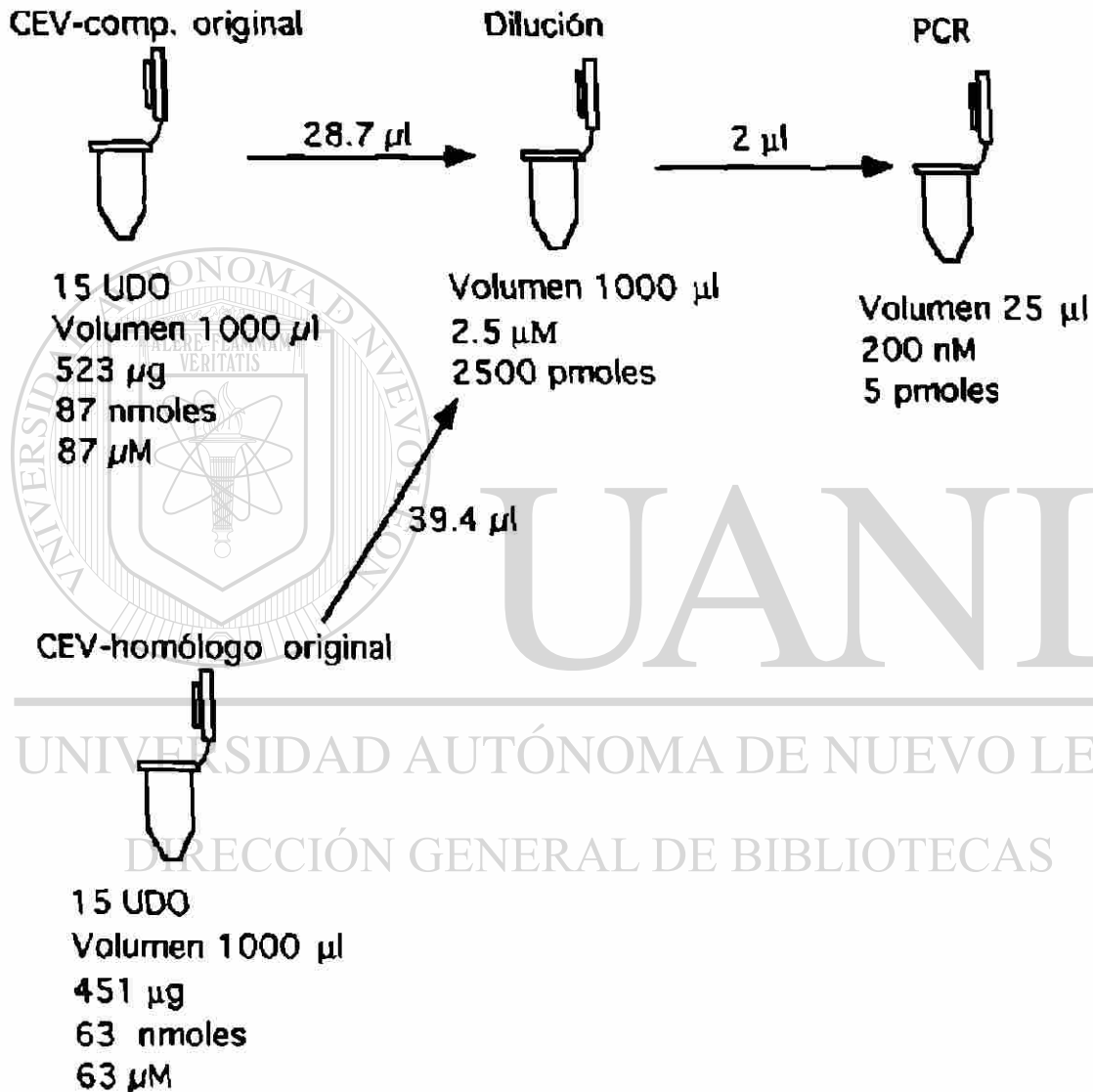


Fig. 25. Características de dilución de los iniciadores sintetizados para la detección del viroide exocortis.

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

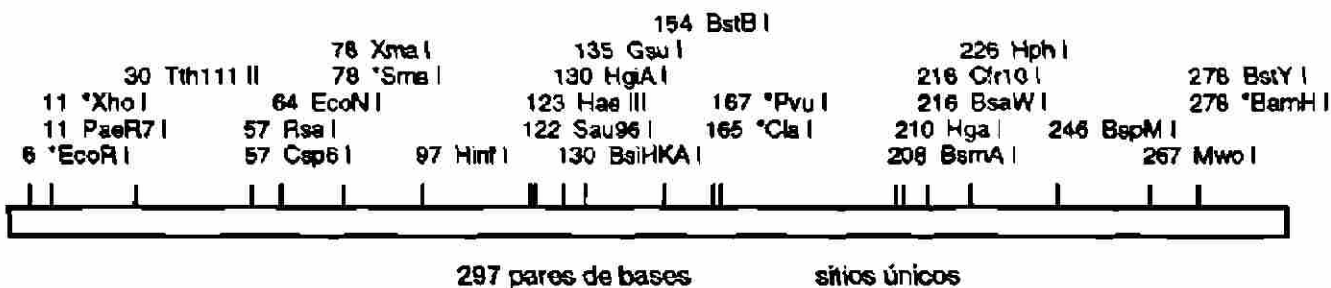


Fig. 26. Mapa gráfico de restricción del viroide cachexia simulado con el programa DNA Strider.

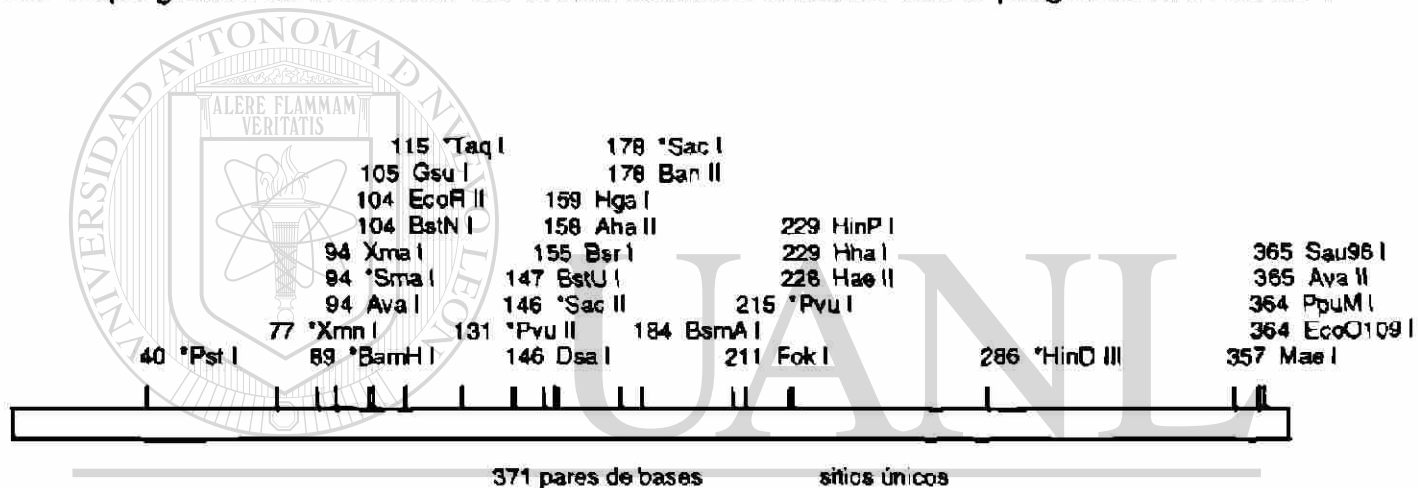


Fig. 27. Mapa gráfico de restricción del viroide exocortis simulado con el programa DNA Strider.

