



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 101 (2):
45-49; 2024



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

Av. William Cross 3150
T4101XAC - Las Talitas.
Tucumán, Argentina.

La RT-PCR como metodología para el diagnóstico del viroide del enanismo de los cítricos y del viroide de la curvatura de la hoja de los cítricos en el Noroeste Argentino

María F. Palacios * y Julia Figueroa*

* Sección Centro de Saneamiento. Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombres (EEAOC), Las Talitas, Tucumán, Argentina. Email: saneamiento@eeaac.org.ar

RESUMEN

Los cítricos son hospederos naturales de varias especies de viroides. En Argentina hasta 2022 solamente estaban reportados el *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) y el *Hop Stunt Citrus Viroid* (HSVd), agentes causales de la Exocortis y de la Caquexia respectivamente.

En razón de que la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una técnica sensible, fiable, económica y de amplia utilización para la detección de diferentes agentes patógenos e implementada en centros de saneamiento cítrico referentes a nivel mundial, el objetivo de este trabajo fue la optimización e incorporación de esta metodología como técnica de rutina del laboratorio para la detección de ambos viroides. A través de un proceso de ajuste se optimizó el protocolo de RT-PCR para la identificación de los viroides causantes del enanismo de los cítricos, el *Citrus Dwarfing Viroid* (CDVd) y la curvatura de la hoja de los cítricos, *Citrus Bent Leaf Viroid* (CBLVd). La metodología optimizada demostró ser eficaz para la detección de ambos viroides en diversas especies cítricas, tanto en variedades copa como en portainjertos de quintas cítricas del noroeste argentino, lo que valida su implementación como herramienta de diagnóstico de rutina en el laboratorio del Centro de Saneamiento de Citrus (CSC).

Palabras clave: enfermedades transmisibles por injerto, detección molecular, certificación de material de propagación.

ABSTRACT

Incorporation of RT-PCR as a methodology for diagnosis of Citrus Bent Leaf Viroid and Citrus Dwarfing Viroid

Citrus trees are natural hosts to several viroid species. Until 2022, only *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) and *Hop Stunt Viroid* (HSVd), the causal agents of Exocortis and Cachexia, respectively, had been reported in Argentina. Given the sensitivity, reliability, cost-effectiveness, and widespread use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for pathogen detection, the aim of this work was to optimize and establish this methodology as a routine laboratory technique for the detection of these viroids.

In this study, the RT-PCR protocol was optimized for the detection and identification of *Citrus Dwarfing Viroid* (CDVd) and *Citrus Bent Leaf Viroid* (CBLVd). The methodology proved to be effective for detecting both viroids in various citrus species, including both scions and rootstocks from citrus orchards in the northwest of Argentina, thus validating its implementation as a routine diagnostic tool in the CSC laboratory.

Key words: graft transmissible diseases, molecular diagnosis, indexing program.

Fecha de
recepción:
23/08/2024

Fecha de
aceptación:
18/06/2025

INTRODUCCIÓN

La citricultura representa una de las principales actividades frutícolas de Argentina, con un marcado impacto económico y social en las regiones productoras. La provincia de Tucumán concentra la mayor superficie cultivada con limón (*Citrus limon* (L.) Burm. f.), posicionándose como el principal polo cítrico nacional y uno de los más relevantes a nivel mundial en términos de producción, industrialización y exportación. En este contexto, la sanidad de los materiales de propagación constituye un componente crítico para la sostenibilidad del sistema productivo.

En Argentina, las normas para la producción, comercialización e introducción de plantas cítricas de vivero y sus partes (Res.458/2023 de INASE) establecen la obligatoriedad del uso de material de propagación cítrico fiscalizado de alta calidad genética, saneado por la técnica de microinjerto de ápices caulinares y libres de determinadas enfermedades transmisibles por injerto. Las enfermedades causadas por patógenos como virus, bacterias y fitoplasmas pueden propagarse fácilmente a través de injertos, lo que acentúa la necesidad de una detección temprana para tomar decisiones adecuadas para su manejo, prevenir su dispersión y minimizar pérdidas económicas en la producción de cultivos (Olmos *et al.*, 2007; Venbrux *et al.*, 2023).

La normativa vigente hasta 2023 establecía el uso del diagnóstico biológico, la hibridación de improntas y la electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) como únicas metodologías autorizadas para detección de viroides cítricos (Res. 149/98, MEOSP-SAGPyA). Dichas técnicas requieren mucho tiempo, infraestructura y condiciones ambientales específicas que las hacen laboriosas y costosas y en la mayoría de los casos permiten la detección de los viroides presentes en las muestras pero de manera inespecífica, sin posibilidad de identificación.

Las técnicas moleculares como la reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) han demostrado ser herramientas valiosas para el diagnóstico de enfermedades transmisibles por injerto.

El proceso de validación de las técnicas de diagnóstico implica evaluar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, asegurando que éstas proporcionen resultados precisos y útiles. La validación de métodos de diagnóstico es esencial para garantizar la detección oportuna de plagas y enfermedades, lo que a la vez contribuye a la seguridad alimentaria y la sostenibilidad agrícola (Luchi *et al.*, 2020).

En este trabajo se describe la estandarización del método de detección molecular por RT-PCR de dos viroides cítricos que fueron recientemente citados en Argentina (Palacios y Figueroa, 2022), el *Citrus Bent Leaf Viroid* (CBLVd) y *Citrus Dwarfing Viroid* (CDVd), con el objetivo de incorporar en el laboratorio una técnica de diagnóstico más rápida, sensible y específica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material de referencia se utilizaron los controles T-0001, T-0002 y T-2209 para CDVd y T-0178 y T-0180 para CBLVd (Tabla 1). Los productos de amplificación del genoma de estos cinco aislados fueron previamente secuenciados y las secuencias resultantes se depositaron en la base de acceso libre, GenBank, con los siguientes números de acceso: OK181215, OK181216 y OK181217 (CDVd) y OK181218 y OK181219 (CBLVd).

Los alineamientos de las secuencias en BLASTn revelaron una identidad mayor al 96% con las secuencias de referencia correspondientes para cada viroide.

Además, se incluyeron otros 10 controles positivos seleccionados de plantas infectadas con CDVd y/o CBLVd del banco de virus y viroides del CSC previamente caracterizados por métodos moleculares (Tabla 1).

Se trabajó también con muestras de 25 plantas

Tabla 1. Controles positivos utilizados en el ensayo.

Identificación Interna	Origen	Especie	Variedad
T-0001*	Tucumán - Lules	<i>C. reshni</i>	Cleopatra
T-0002*	Salta - Orán	<i>C. sinensis</i>	Valencia
T-0010	Tucumán - Colección EEAOC	<i>C. sinensis</i>	Ruby Blood
T-0011	Tucumán - Colección EEAOC	<i>C. sinensis</i>	Ruby Blood
T-0096	Salta - Orán	<i>C. sinensis</i>	Jaffa
T-0178**	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge La Toma
T-0180**	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge La Toma
T-0186	Tucumán - Lules	<i>C. sinensis</i>	Marr's Early
T-0202	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge La Toma
T-0205	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge La Toma
T-0312	Jujuy - Ledesma	<i>C. limon</i>	Eureka
T-0398	Tucumán - Las Cañitas	<i>C. limon</i>	Eureka
T-0455	Tucumán - Lules	<i>Citrumelo</i>	CPB 4475
T-1905	Tucumán - Colección EEAOC	<i>C. paradisi</i>	Rouge La Toma
T-2209*	Tucumán - La Cocha	<i>C. limon</i>	Eureka

*Aislados de referencia para CDVd. **Aislados de referencia para CBLVd.

de campo infectadas con viroides, con y sin síntomas, provenientes de las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán, que incluyeron pomelos, naranjos dulces, limoneros y un Citrumelo 75 AB (Tabla 2). El objetivo fue garantizar que la población analizada fuera representativa de la región en relación a su origen, especies y variedades.

Para corroborar la especificidad de la prueba se utilizaron ocho muestras infectadas con otros virus tales

como el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), psorosis de los cítricos (CPsV), concave gum (CGAV) y los viroides CEVd y HSVd, detalladas en la Tabla 3.

Los métodos de referencia que se utilizaron fueron las pruebas de diagnóstico biológicas con planta indicadora de cidro Etrog injertado sobre limonero rugoso y el diagnóstico molecular por sPAGE descritos en el anexo III de la Resolución 479/2023 de INASE.

Tabla 2. Muestras de campo utilizadas en el ensayo.

Identificación Interna	Origen	Especie	Variedad
R-1321	Salta - Urundel	<i>C. paradisi</i>	Henninger's
R-1324	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Foster Seedlees
R-1789	Tucumán - Lules	<i>C. sinensis</i>	Pineapple
R-2123	Tucumán - Famaillá	<i>C. limon</i>	Adamo
R-2199	Tucumán - Famaillá	<i>C. limon</i>	Interdonato
R-2244	Tucumán - Lules	<i>C. sinensis</i>	Pineapple
R-2242	Tucumán - Lules	<i>C. sinensis</i>	Pineapple
R-2206	Tucumán - La Cocha	<i>C. limon</i>	Eureka
R-2207	Tucumán - La Cocha	<i>C. limon</i>	Eureka
R-2208	Tucumán - La Cocha	<i>C. limon</i>	Eureka
R-2210	Tucumán - La Cocha	<i>C. limon</i>	Eureka
R-2376	Jujuy - Ledesma	<i>Citrumelo</i>	75 AB
R-2723	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rio Red
R-2725	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rio Red
R-2726	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rio Red
R-2727	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rio Red
R-2731	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Flame
R-2732	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Flame
R-2733	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Flame
R-2734	Salta - Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Flame
R-3079	Tucumán - Colección EAAOC	<i>C. limon</i>	Napoles
R-3080	Tucumán - Colección EAAOC	<i>C. limon</i>	Kennedy
R-3081	Tucumán - Colección EAAOC	<i>C. limon</i>	Giardino
R-3082	Tucumán - Colección EAAOC	<i>C. limon</i>	Amalfi
R-3083	Tucumán - Colección EAAOC	<i>C. limon</i>	Damas

Tabla 3. Muestras infectadas con otros patógenos utilizadas en el ensayo.

Identificación Interna	Patógeno	Especie	Variedad
T-0008	CEVd	<i>C. limon</i>	Sin identificar
T-0053	CPsV	<i>C. sinensis</i>	Westin
T-0069	CEVd	<i>C. latifolia</i>	L. Rangpur
T-0074	HSVd	<i>C. sinensis</i>	Cape Nartge
T-0127	CCGAV	<i>Citrange</i>	Carrizo
T-0184	CEVd	<i>C. limon</i>	Limoneira 8A
T-0514	CEVd	<i>C. limon</i>	Lisboa
T-0706	CTV	<i>C. reshni</i>	m Cleopatra

RT-PCR como método cualitativo para determinación de presencia/ausencia de CBLVd y CDVd

La extracción de ácidos nucleicos totales se realizó a partir de corteza tierna, pecíolos y nervadura central de hojas jóvenes de plantas cítricas por las técnicas de SDS-KOAc (Garnsey *et al.*, 2002) para material vegetal de campo o de invernadero, o de Semancik *et al.* (1975) para plantas de cidro Etrog inoculadas del diagnóstico biológico.

Los análisis para cada viroide se ejecutaron en reacciones separadas (simplex).

Se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica para la selección de cebadores empleados para el CDVd y CBLVd, escogiéndose los diseñados por Ito, Ieki y Ozaki en 2002 (Tabla 4), por su capacidad para detectar todas las variantes de dichos patógenos.

Tabla 4. Secuencia de cebadores específicos utilizados para la amplificación de ARN genómico de aislados de CBLVd y CDVd mediante RT-PCR.

Patógeno	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón
CBLVd	CBLVd-CM2- R	TCGACGACGACCAGTCAGCT	233 pb
	CBLVd-AP2- F	TCCCCTTCACCCGAGCGCTGC	
CDVd	CVdIII-AM- R	TCACCAACTTAGCTGCCTTCGTC	271 pb
	CVdIII-AP- F	CTCCGCTAGTCGGAAAGACTCCGC	

La reacción para la síntesis de ADNc consistió en 2 µl - de ARN total; 7,5 µM del cebador complementario, 5X RT buffer (Promega, Madison, WI, EEUU), 10 mM de mix de dNTP (Promega, Madison, EEUU), 25 mM MgCl₂ y las enzimas Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific Inc.) y Revert Aid Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc.), según las instrucciones del proveedor. Las reacciones se incubaron a 42°C durante 1 h. La PCR se llevó a cabo utilizando 2 µl de ADNc como templado; 0,2 µM de cebadores homólogo y complementario; 0,2 mM dNTPs; 10 X Taq Buffer; 1 mM MgCl₂; 1 U Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific Inc.) y agua de grado molecular hasta un volumen total de 20 µl. Las condiciones de ciclado de PCR fueron 1 ciclo de 94°C por 2 min, 40 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min y 1 ciclo de 72°C por 5 min. Los productos finales de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%, teñido con GelRed 10000 X.

RESULTADOS

RT-PCR y comparación con métodos de referencia

Los resultados de las muestras analizadas por RT-PCR y los métodos de referencia se detallan a continuación (Tabla 5).

Los controles referentes de CDVd (muestras 1, 2 y 15) y CBLVd (muestras 6 y 7) y los demás controles positivos fueron detectados por los tres métodos utilizados.

Todas las muestras de campo, tanto de planta con síntomas como asintomáticas, resultaron positivas para viroides por diagnóstico biológico y sPAGE y por el

Tabla 5. Resultados obtenidos por muestra con el método de validación y métodos de referencia.

Identificación Interna	sPAGE	Diagnóstico Biológico		RT-PCR	
		Viroides		CBLVd	CDVd
1	T-0001 (Ref CDVd)	+	+	-	+
2	T-0002 (Ref CDVd)	+	+	-	+
3	T-0010	+	+	-	+
4	T-0011	+	+	-	+
5	T-0096	+	+	-	+
6	T-0178 (Ref CBLVd)	+	+	+	+
7	T-0180 (Ref CBLVd)	+	+	+	+
8	T-0186	+	+	-	+
9	T-0202	+	+	+	+
10	T-0205	+	+	+	+
11	T-0312	+	+	-	+
12	T-0398	+	+	-	+
13	T-0455	+	+	-	+
14	T-1905	+	+	+	+
15	T-2209 (Ref CDVd)	+	+	-	+
16	R-1321	+	+	+	+
17	R-1324	+	+	+	+
18	R-1789	+	+	-	+
19	R-2123	+	+	-	+
20	R-2199	+	+	-	+
21	R-2244	+	+	-	+
22	R-2242	+	+	-	+
23	R-2206	+	+	-	+
24	R-2207	+	+	-	+
25	R-2208	+	+	-	+
26	R-2210	+	+	-	+
27	R-2376	+	+	-	+
28	R-2723	+	+	+	+
29	R-2725	+	+	+	+
30	R-2726	+	+	+	+
31	R-2727	+	+	+	+
32	R-2731	+	+	+	+
33	R-2732	+	+	+	+
34	R-2733	+	+	+	+
35	R-2734	+	+	+	+
36	R-3079	+	+	+	+
37	R-3080	+	+	+	+
38	R-3081	+	+	+	+
39	R-3082	+	+	+	+
40	R-3083	+	+	+	+
41	T-0008 (CEVd)	+	+	-	-
42	T-0053 (CPsV)	-	-	-	-
43	T-0069 (CEVd)	+	+	-	-
44	T-0074 (HSVd)	+	+	-	-
45	T-0127 (CCGAV)	-	-	-	-
46	T-0184 (CEVd)	+	+	-	-
47	T-0514 (CEVd)	+	+	-	-
48	T-0706 (CTV)	-	-	-	-

Resultado +: Detectado; Resultado -: No Detectado

método de RT-PCR se pudo confirmar la presencia de CDVd de manera individual o coinfectado con CBLVd.

No se observó amplificación en ninguna de las muestras de plantas infectadas con otros patógenos (muestras 41 a 48) con el método ajustado, demostrando la alta especificidad del mismo.

El método biológico permite detectar viroides tanto individuales como en mezcla sin posibilidad de identificación (Ito *et al.*, 2002). Por esto, las muestras T-0008, T-0069, T-0184 y T-0514 que contenían CEVd y la T-0074 infectada con HSVd manifestaron síntomas en el diagnóstico biológico y mostraron bandas en el gel mediante el diagnóstico por sPAGE, pero estaban libres de CDVd y CBLVd. Como testigos negativos se incluyeron además muestras de 57 plantas madres sanas del CSC y cinco plantas de invernadero sin inocular, las que resultaron negativas con todas las técnicas.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de las 110 plantas analizadas mostraron 100% de correlación con los métodos de referencia utilizados.

Mediante la técnica propuesta se pudo detectar la presencia de CDVd y CBLVd en los controles positivos correspondientes. Respecto a los testigos negativos, las 70 plantas sanas o infectadas con otros patógenos no presentaron amplificación.

Las 25 muestras de campo analizadas, tanto de plantas con síntomas como asintomáticas que resultaron positivas para viroides por los otros dos métodos ensayados, amplificaron para CDVd y/o CBLVd.

Por todo lo anteriormente detallado, este trabajo demuestra que la RT-PCR con los cebadores seleccionados es una herramienta apropiada para el diagnóstico de CBLVd y CDVd en aislados de la región y por lo tanto, se incorpora como método de rutina. Como ventaja adicional, permitió la identificación inequívoca de los viroides estudiados requiriendo un tiempo significativamente inferior (48 horas) para la obtención de resultados, en comparación con las otras técnicas disponibles hasta el momento.

El uso complementario de dos o más metodologías incrementa la seguridad y la confiabilidad de los resultados y minimiza la incertidumbre, sobre todo en aquellos casos de importación y exportación de material vegetal, certificación o cuarentena (Olmos *et al.*, 2008). En este sentido, la puesta a punto del presente método representa una tercera alternativa diagnóstica que contribuye al fortalecimiento del sistema de detección.

Finalmente, el trabajo realizado fue analizado por el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Fitopatología de la Dirección de Calidad del INASE e incorporado posteriormente como metodología habilitada en el anexo II de la vigente normativa (Resolución 479/2023), lo que constituye un aporte relevante del Centro de Saneamiento de Citrus de la EAAOC al sistema nacional de certificación cítrico.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Garnsey, S. M.; D. L. Zies; M. Irely; P. J. Sieburth; J. S. Semancik; L. Levy and M. E. Hilf. 2002.** Practical Field Detection of Citrus Viroids in Florida by RT-PCR. En: Proc. Conf. IOCV, 15 Riverside, CA, USA, pp. 219-229.
- INASE. 2023.** Normativas. Resolución 458/2023. Publicado en internet, disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/291056/20230727> (consultado julio 2024).
- INASE. 2023.** Normativas. Resolución 479/2023. Anexo II. Publicado en internet, disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/291916/20230810?busqueda=2> (consultado julio 2024).
- Ito, T.; H. Ieki; K. Ozaki; T. Iwanami; K. Nakahara; T. Hataya; M. Isaka and T. Kano. 2002.** Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.
- Ito, T.; H. Ieki and K. Ozaki. 2002.** Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 106: 235-239.
- Luchi, N.; R. Ios & A. Santini. 2020.** Fast and reliable molecular methods to detect fungal pathogens in woody plants. *Appl Microbiol Biotechnol* 104: 2453-2468. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10395-4>.
- Ministerio de Economía, Obras y Servicios Públicos, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (MEOSP-SAGPyA). Resolución 149/98. 1998.** Normas para la producción, comercialización e introducción de plantas cítricas de vivero y sus partes. MEOSP-SAGPyA, Buenos Aires. Argentina.
- Olmos, A.; N. Capote; E. Bertolini y M. Cambra. 2007.** Molecular diagnostic methods for plant viruses. *Biotechnology and Plant Disease Management*; 227-249.
- Olmos, A.; E. Bertolini y M. Cambra. 2008.** Validación de métodos de detección y diagnóstico de patógenos y costes de la especificidad y sensibilidad. *Boletín SEF* (63): 7-11.
- Palacios, M. & J. Figueroa. 2022.** First report of CBLVd and CDVd in Argentina. *Journal of Citrus Pathology*, 9. <http://dx.doi.org/10.5070/C49151296>. Retrieved from <https://escholarship.org/uc/item/7212n0wp>
- Semancik, J. S.; T. J. Morris; L. G. Weathers; G. F. Rordorf and D. R. Kearns. 1975.** Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology* 63: 160-167.
- Venbrux, M.; S. Crauwels and H. Rediers. 2023.** Current and emerging trends in techniques for plant pathogen detection. *Front Plant Sci.* May 8; 14:1120968. doi: 10.3389/fpls.2023.1120968. PMID: 37223788; PMCID: PMC10200959.