



Revista Industrial
y Agrícola de
Tucumán

ISSN 0370-5404

En línea
1851-3018

Tomo 100 (2):
53-56; 2023



ESTACION EXPERIMENTAL
AGROINDUSTRIAL
OBISPO COLOMBRES
Tucumán | Argentina

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

Incorporación de la RT-PCR como metodología para el diagnóstico de la exocortis de los cítricos

María F. Palacios* y J. Figueroa*

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

RESUMEN

El cultivo de los cítricos se ve afectado a nivel mundial por numerosas enfermedades transmisibles por injerto entre las cuales la exocortis de los cítricos, causada por *Citrus exocortis viroid* (CEVd), ocasiona importantes pérdidas económicas por disminución en la producción y hasta la muerte de las plantas afectadas. En este trabajo se buscó incorporar la técnica de RT-PCR como método cualitativo para la determinación de la presencia/ausencia de este viroide. Se trabajó con cebadores específicos y se utilizó el diagnóstico biológico y la electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) como métodos de referencia. Las muestras analizadas se recolectaron de plantas cítricas de diferentes especies, cultivares e híbridos interespecíficos de quintas de las provincias de Tucumán, Salta y Jujuy (noroeste de Argentina). Se compararon los resultados obtenidos con las tres técnicas y se comprobó que el método de detección desarrollado es altamente reproducible, sensible y específico.

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

ABSTRACT

Incorporation of RT-PCR as a methodology for diagnosis of citrus exocortis viroid

Citrus are affected by numerous graft-transmissible diseases. Among them, exocortis disease, caused by *Citrus exocortis viroid* (CEVd) reduces yield and can even cause the death of affected trees producing significant economic losses. The purpose of this work was to incorporate the RT-PCR technique as a qualitative presence/absence diagnostic method for this viroid. Specific primers were used and biological diagnosis and sequential polyacrylamide gel electrophoresis (sPAGE) were performed as reference methods. Samples analyzed were collected from citrus plants of different species and cultivars and interspecific hybrids from citrus orchards in Tucumán, Salta and Jujuy provinces (northwest Argentina). Results obtained with the three techniques were compared, verifying that the detection method developed is highly reproducible, sensitive and specific.

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

Fecha de
recepción:
10/07/2023

Fecha de
aceptación:
29/08/2023

INTRODUCCIÓN

Los programas de manejo y prevención de fitopatógenos requieren el empleo de métodos de detección y diagnóstico validados para asegurar que el resultado indique el verdadero estado fitosanitario de la planta. Las organizaciones mundiales como la Organización Mundial de Epizootias (OIE), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre otras, exigen este requisito como indispensable para el reconocimiento mutuo de resultados y la aceptación de nuevas técnicas entre la comunidad científica (Wright *et al.*, 1993). La validación de los métodos de diagnóstico permite, además, su implementación en diferentes condiciones de trabajo y que sus resultados sean aceptados por otros investigadores, así como la utilización de esos métodos para la certificación de material de propagación vegetal (Llanes-Alvarez *et al.*, 2017).

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 certificado de alta calidad genética, saneado por la técnica de microinjerto de ápices caulinares y libre de determinadas enfermedades transmisibles por injerto, entre las cuales se encuentra la exocortis de los cítricos.

En razón de que la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es una técnica sensible y fiable, económica y de amplia utilización para la detección de diferentes agentes patógenos e implementada en centros de saneamiento cítrico referentes a nivel mundial, se realizó la optimización e incorporación de esta metodología para la detección del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el ensayo se emplearon como estándares de referencia, controles de estado sanitario conocido respecto al patógeno en cuestión (infectado o positivo y no infectado o negativo). Los controles positivos empleados fueron muestras vegetales de 12 aislamientos de CEVd mantenidos en plantas de cítricos en el banco de virus y viroides del Centro de Saneamiento de Citrus (CSC) de la Estación Experimental Agroindustrial Obispo Colombes (EEAOC) (Tabla 1). Estos fueron recolectados

de diferentes especies y variedades cítricas de la región del noroeste argentino, detectados y caracterizados en el laboratorio del CSC a lo largo de los años de diagnóstico e investigación por los métodos biológicos y sPAGE.

Como controles negativos se incluyeron 14 plantas sanas y 6 muestras de aislamientos enfermos con otros viroides: *Hop Stunt Viroid* (HSVd), *Citrus Dwarfing Viroid* (CDVd) y *Citrus Bent Leaf Viroid* (CBLVd) detalladas a continuación en la Tabla 2.

Los métodos de referencia fueron las pruebas de diagnóstico biológicas (Roistacher, 1991) y sPAGE (Duran-

Tabla 1. Controles positivos utilizados en el ensayo.

Identificación Interna	Origen	Especie	Variedad
T-0008	Tucumán-Los Nogales	<i>C. limon</i>	Desconocida
T-0009	Tucumán-Colección EEAOC	<i>C. sinensis</i>	Ruby Blood
T-0010	Tucumán-Colección EEAOC	<i>C. sinensis</i>	Ruby Blood
T-0011	Tucumán-Colección EEAOC	<i>C. sinensis</i>	Ruby Blood
T-0069	Tucumán-Colección EEAOC	<i>C. latifolia</i>	Tahití
T-0178	Salta-Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge LaToma
T-0184	Tucumán-Los Nogales	<i>C. limon</i>	Limoneira8A
T-0202	Salta-Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge LaToma
T-0205	Salta-Colonia Santa Rosa	<i>C. paradisi</i>	Rouge LaToma
T-0394	Tucumán-El Carmen	<i>C. sinensis</i>	Maltese
T-0398	Tucumán-Las Cañitas	<i>C. limon</i>	Eureka
T-0514	Tucumán-Cochamolles	<i>C. limon</i>	Lisboa

Tabla 2. Controles negativos utilizados en el ensayo.

Identificación Interna	Estatus sanitario	Especie	Variedad
T-0001	Positivo HSVd y CDVd	<i>C. reshni</i>	Cleopatra
T-0074	Positivo HSVd	<i>C. sinensis</i>	Cape Nartge
T-0180	Positivo CBLVd, HSVd y CDVd	<i>C. paradisi</i>	Rouge LaToma
T-0186	Positivo CDVd	<i>C. sinensis</i>	Marrs Early
T-0212	Positivo HSVd y CDVd	<i>C. sinensis</i>	Valencia
T-0455	Positivo HSVd y CDVd	<i>C. paradisi</i> x <i>P. trifoliata</i>	CPB 4475
R-1617	Planta sana	<i>C. sinensis</i>	Valencia
R-0504	Planta sana	<i>C. limonia</i>	Rangpur
R-0505	Planta sana	<i>C. volkameriana</i> x <i>C. reshni</i>	81G220
R-1627	Planta sana	<i>C. sinensis</i>	Valencia
R-0523	Planta sana	<i>C. reshni</i> x <i>P. trifoliata</i>	X-639
R-0525	Planta sana	<i>C. volkameriana</i> x <i>C. reshni</i>	81G513
R-1620	Planta sana	<i>P. trifoliata</i>	Rubidoux
R-0604	Planta sana	<i>C. sinensis</i>	Tarocco
R-0245	Planta sana	<i>C. medica</i>	Cidro Etrog
R-1348	Planta sana	<i>Citrus clementina</i> x (<i>Citrus paradisi</i> . x <i>Citrus tangerina</i>)	Nova
R-1349	Planta sana	<i>Citrus reticulata</i> x <i>Citrus sinensis</i>	Murcott
R-1357	Planta sana	<i>C. limon</i>	Limoneira 8A
R-1358	Planta sana	<i>C. limon</i>	Limoneira 8A
R-1359	Planta sana	<i>C. paradisi</i>	Flame

Vila *et al.*, 1993) descritos en las “Normas de Funcionamiento de los Laboratorios de Diagnóstico de Enfermedades para Plantas Cítricas de Vivero y/o sus Partes” de la Resolución N° 98/03 de SAGPyA.

Además de los controles positivos y negativos se analizaron cinco muestras de campo de limonero Eureka injertado en lima Rangpur (*Citrus limonia Osbeck*) de siete años de edad: cuatro plantas asintomáticas (identificación interna R-2205; R-2206, R-2207 y R-2208) y una con síntomas característicos de descortezamiento del portainjerto (R-2209).

PCR como método cualitativo para determinación de presencia/ausencia de CEVd

Se realizó la extracción de ácidos nucleicos 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 inoculadas.

El diagnóstico por RT-PCR en dos pasos se realizó utilizando el par de cebadores diseñado por Ito *et al.* (2002a): CEV AM3 R (CCGGGGATCCCTGAAGGACTT) y CEV AP3 F (GGAAACCTGGAGGAAGTCGAG). La reacción para la síntesis de ADNc consistió en 2 µl del extracto de ARN total; 7,5 µM del cebador complementario, 5X RT buffer (Promega, Madison, WI, EEUU), 10mM 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 55°C durante 1 h. La fase de PCR se llevó a cabo utilizando 2µl de ADNc como templado; 0,2 µM de cebadores homólogo y complementario; 0,2 mM dNTPs, 10X 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 1,5% teñido con GelRed 10000X.

Criterio de aceptación e interpretación de resultados de la RT-PCR

La visualización en el gel de una banda a la altura esperada (371 pb, aproximadamente) reveló la presencia de CEVd en la muestra. La ausencia de la banda indicó que el viroide ensayado no fue detectado en esa muestra. Para la estimación del tamaño del amplicón, la banda se comparó con el marcador de peso molecular 100-1000 pb sembrado en una calle del gel.

RESULTADOS

RT-PCR y comparación con métodos de referencia

Los resultados de las 37 muestras analizadas por el método RT-PCR ajustado y los métodos de referencia se detallan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos con el método de RT-PCR y métodos de referencia por muestra.

	Identificación Interna	RT-PCR	s-PAGE	Diagnóstico Biológico
1	T-0008	+	+	+
2	T-0009	+	+	+
3	T-0010	+	+	+
4	T-0011	+	+	+
5	T-0069	+	+	+
6	T-0178	+	+	+
7	T-0184	+	+	+
8	T-0202	+	+	+
9	T-0205	+	+	+
10	T-0394	+	+	+
11	T-0398	+	+	+
12	T-0514	+	+	+
13	R-2207	+	+	+
14	R-2208	+	+	+
15	R-2209	+	+	+
16	T-0001	-	-	+
17	T-0074	-	-	+
18	T-0180	-	-	+
19	T-0186	-	-	+
20	T-0212	-	-	+
21	T-0455	-	-	+
22	R-2206	-	-	+
23	R-1617	-	-	-
24	R-0504	-	-	-
25	R-0505	-	-	-
26	R-1627	-	-	-
27	R-0523	-	-	-
28	R-0525	-	-	-
29	R-1620	-	-	-
30	R-0604	-	-	-
31	R-0245	-	-	-
32	R-1348	-	-	-
33	R-1349	-	-	-
34	R-1357	-	-	-
35	R-1358	-	-	-
36	R-1359	-	-	-
37	R-2205	-	-	-

Resultado +: Detectado. Resultado -: No Detectado.

Todos los aislamientos de CEVd, tanto de controles positivos como muestras de campo, fueron detectados por los tres métodos utilizados. Las plantas sanas o las infectadas con otros patógenos resultaron negativas con el método ajustado, demostrando la alta especificidad del mismo.

El método biológico permite detectar viroides tanto individuales como en mezcla sin posibilidad de su

identificación (Ito *et al.*, 2002b). Por esto, las muestras 16 a 22 que no contenían CEVd, igualmente manifestaron síntomas en el diagnóstico por estar infectadas con otros viroides.

La muestra de campo de limonero Eureka R-2209 con síntomas característicos de descortezamiento resultó positiva para CEVd, así como dos de las cuatro plantas asintomáticas (R-2207 y R-2208), lo que evidencia la eficiencia y sensibilidad del método propuesto. Por otro lado, no hubo detección en la muestra sana R-2205 ni R-2206 que estaba infectada con otro viroide.

CONCLUSIONES

La RT-PCR con el protocolo propuesto resulta una técnica apropiada para la detección de CEVd en aislamientos de la región. Dado que en las pruebas de diagnóstico biológico los síntomas son inespecíficos e indican la presencia de diferentes viroides, tanto individuales como en mezcla, esta metodología, además, permite la identificación de CEVd.

Adicionalmente, requiere un tiempo significativamente inferior (48 horas) para la obtención de resultados, en comparación con las otras metodologías disponibles hasta ahora (mínimo de tres meses para sPAGE y seis meses para el diagnóstico biológico). Además, el empleo de dos o más técnicas aumenta la seguridad y confianza del resultado y minimiza la incertidumbre, sobre todo en aquellos casos de importación y exportación de material vegetal, certificación o cuarentena (Olmos *et al.*, 2008). Por ello, con la incorporación de este método se presenta una alternativa a los ya disponibles y con ventajas adicionales.

Finalmente, la metodología se puso a disposición del Instituto Nacional de Semillas (INASE), organismo que regula la producción, comercialización e introducción de plantas cítricas de vivero y el funcionamiento de los laboratorios de diagnóstico de enfermedades de plantas cítricas de vivero en Argentina. El mencionado protocolo, luego de ser analizado por el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Fitopatología de la Dirección de Calidad del INASE, fue aceptado e incorporado como metodología autorizada para el diagnóstico del viroide de la exocortis de los cítricos (Resolución 479/2023, anexo I).

BIBLIOGRAFÍA CITADA

Llanes-Alvarez, Y.; L. Hernández Rodríguez e I. Peña. 2017. La validación de métodos de diagnóstico como herramienta en los programas de vigilancia y manejo de fitopatógenos. *CitriFruT* 34(1) 46-54.

Duran-Vila, N.; J. A. Pina and N. L. Navarro. 1993. Improved indexing of citrus viroids. En: *Proc. Conf. IOCV*, 12, Riverside, CA, USA, pp. 201-211.

Garnsey, S. M.; D. L. Zies; M. Irej; 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.

Ito, T.; H. Ieki and K. Ozaki. 2002a. 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.

Ito, T.; H. Ieki; K. Ozaki; T. Iwanami; K. Nakahara; T. Hayata; T. Ito; M. Isaka and T. Kano. 2002b. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.

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.

INASE 2003. Normativas. Resolución 98/03 Publicado en internet, disponible en <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-98-2003-83350/texto> (consultado agosto 2023).

INASE. 2023. Normativas. Resolución 458/2023. Publicado en internet, disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/291056/20230727> (consultado agosto 2023).

INASE. 2023. Normativas. Resolución 479/2023. Publicado en internet, disponible en <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/291916/20230810?busqueda=2> (consultado agosto 2023).

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

Roistacher, C. N. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome, Italy.

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.

Wright, P. F.; E. Nilsson; E. M. A. Van Rooij; M. Leleta and M. H. Jeggo. 1993. Standardization and validation of enzyme linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12 (2): 435-450.