

Evaluación de cuatro métodos de extracción de ARN viroide para el diagnóstico molecular de CEVd en *Citrus limon* mediante RT-PCR, Dot blot y Northern blot

✉ Rodolfo Umaña¹, Clara Pritsch¹, Juan R Arbiza², Fernando Rivas³, Gabriela Pagliano¹

¹Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República Garzón 780, Montevideo, Uruguay

²Sección Virología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

³Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Inia Ruta 3 Camino al Terrible. Salto, Uruguay
E-mail: rumana@fagro.edu.uy

RESUMEN

En el desarrollo de metodologías moleculares diagnósticas en variedades cítricas propensas a infección viroide, se precisa la extracción eficiente de ARN, siguiendo criterios de concentración y pureza. Los contaminantes remanentes pueden afectar la detección según la herramienta molecular escogida. Esta condición se analiza a partir del espectro de absorción del ARN; mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y por los niveles de intensidad de las señales de *Northern blot* y *Dot blot*, en términos de respuesta analítica/sensibilidad. Se evaluaron cuatro métodos de extracción de ARN, por sus efectos sobre la detección de presencia/ausencia del *Citrus Exocortis Viroid* (CEVd) en *Citrus limon* mediante análisis moleculares diagnósticos: 1) extracción viroide convencional (EVC); 2) fenol/tiocianato de guanidina (FTG); 3) SDS/acetato de potasio (SAP); y 4) formaldehído/SSC (FS). Los valores del tejido de floema estuvieron entre 7500 ng/μL y 1200 ng/μL y los rangos entre 1.3 y 2.0 OD_{260/280}. La evaluación por aproximaciones de la RT-PCR reflejó las ampliaciones esperadas del genoma completo del CEVd; sin embargo, aún se discuten los escenarios erráticos. Las hibridaciones no radiactivas revelaron señales de alta intensidad (132 UR) para el tejido infectado, según el método de EVC, y la definición del límite de positividad para la presencia de infección (78 UR). Las herramientas basadas en hibridaciones moleculares interfieren en el diagnóstico, por la rigurosidad del protocolo y las condiciones del ARN molde. La extracción viroide como punto de partida de una detección exitosa y los métodos moleculares ensayados, mostraron las posibilidades diagnósticas de la asociación de *Northern blot* con la EVC.

Palabras clave: CEVd, diagnóstico, *Northern blot* no radiactivo, RT-PCR, viroides cítricos

Biotecnología Aplicada 2013;30:125-130

ABSTRACT

Evaluation of four viroid RNA extraction methods for the molecular diagnosis of CEVd in *Citrus limon* using RT-PCR, Dot blot and Northern blot. An efficient method for RNA extraction that leads to RNA high yield and purity is a technical issue relevant for development and optimization of molecular diagnostic methods aimed to detect viroid infections in citrus varieties. Residual contaminants may affect RNA detection depending on the molecular diagnosis approaches. This condition can be evaluated through RNA absorption spectrum analysis. Functionally, it is assessed through observation of RT-PCR amplification products and Northern blot and Dot-blot signal intensities, displaying levels of analytical response/sensitivity. Four RNA extraction methods were evaluated to determine their effects on the capacity to detect viroid CEVd presence/absence in *Citrus limon* through four molecular diagnostic approaches: 1) conventional viroid extraction (CVE); 2) phenol/guanidine thiocyanate (PGT), 3) SDS/potassium acetate (SPA); and 4) formaldehyde/SSC (FS). Phloem tissue quantifications showed values between 7500 ng/μL and 1200 ng/μL and ranged 1.3-2.0 OD_{260/280}. Evaluations through RT-PCR showed the expected amplifications of the entire CEVd genome, but erratic scenarios still remained. Non-radioactive probe hybridization techniques revealed high intensity signals (132 RU) for infected tissue, by using the CVE method, and a positivity cut-off for the presence of infection was established (78 RU). Nevertheless, molecular hybridization tools can jeopardize the diagnosis due to the thoroughness of the protocol and the RNA template conditions. The diagnostic ability of the association of Northern blot with CVE viroid extraction analyses as starting point was evidenced for successful detection, among the molecular methods tested.

Keywords: CEVd, diagnostic, non-radioactive Northern blot, RT-PCR, citrus viroids

Introducción

Los viroides de cítricos o *citrus viroids* (CVd) son organismos patógenos subvirales de la familia *Positiviridae*. Carecen de cápside proteica y están conformados únicamente por ARN circular (284-375 nucleótidos), hebra simple cerrada covalentemente, no codificante y estructura secundaria con regiones de elevada complementariedad intramolecular [1]. De acuerdo con la clasificación sugerida por

Flores *et al.* [2] con las modificaciones del Grupo de Estudio de Viroides del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) (www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp), los CVd se componen de las especies *CEVd*, *CBLVd*, *HSVd*, *CDVd*, *CBCVd*, *CVd-V* y *CVd-VI*.

En general, el diagnóstico de infecciones por CVd implica importantes limitaciones. Los métodos basa-

1. Flores R. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. *C.R.Acad Sci III*. 2001; 324(10):943-52.

dos en ensayos biológicos son laboriosos, de baja especificidad, involucran la amplificación del viroide en plantas indicadoras y requieren largos periodos. A su vez, su diagnóstico molecular, basado en la detección de su genoma completo, se afecta por la estructura molecular de los CVd y su efecto en el tejido infectado. La ausencia de cápside ha impedido el empleo de técnicas inmunológicas, mientras que el fuerte apareamiento intramolecular y el bajo e irregular título de partículas viroides en los tejidos infectados han llevado a diagnósticos moleculares errados [3, 4].

Se han desarrollado varios métodos de detección molecular de los CVd, con el objetivo de incrementar la sensibilidad, especificidad y precisión de los resultados, disminuir los tiempos de diagnóstico y optimizar el uso de productos de baja toxicidad, no radiactivos. Estos métodos se basan en la amplificación enzimática del genoma viroide (por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa; RT-PCR) o en hibridaciones ARN-ARN o ARN-ADN. Ello requiere protocolos de extracción de ARN, simples y de bajo costo que provean ácidos nucleicos vegetales enriquecidos en ARN del viroide, y con bajos niveles de agentes contaminantes que afecten en menor cuantía el proceso de detección [5-7].

Los protocolos de extracción de ARN para la detección de viroides [8-11] difieren según el tipo de planta (de campo o bioindicadora) y el tejido de muestra, el tratamiento químico de la muestra, el tiempo de manipulación, el nivel de recuperación del ARN viroide (ARNvd) y la presencia de contaminantes remanentes. En consecuencia, el método de extracción se debe ajustar al método de detección.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza ampliamente para el diagnóstico de viroides en cítricos [12-14]. Aunque la RT-PCR del genoma viroide se ha utilizado exitosamente para la clonación y secuenciación de viroides [15], se ha descrito que su especificidad y eficiencia presentan limitaciones. Entre ellas, la elevada similitud de secuencias entre genomas viroides de otros géneros dificulta el diseño de cebadores específicos [16, 17]. A su vez, la estructura secundaria determina la presencia de amplicones de tamaños no esperados como consecuencia de la renaturalización y reestructuración de la secuencia viroide a bajas temperaturas de la RT-PCR [18]. La permanencia de inhibidores derivados de la extracción de ARN, tales como compuestos fenólicos y polisacáridos podría generar falsos negativos. En el material de campo son frecuentes las amplificaciones inespecíficas de alto y bajo peso molecular, que provocan confusión en la validez del resultado diagnóstico [15, 19]. En consecuencia, se ha cuestionado la integración de la técnica RT-PCR como herramienta rutinaria en los programas de certificación y cuarentena [6, 20].

La hibridación molecular es otra estrategia de detección de viroides, que depende de una exitosa asociación de la sonda con la molécula de ARNvd desplegada. Por tanto, en el desempeño de la técnica son importantes los tratamientos del ARNvd con calor y reactivos desnaturizantes [7]. Las sondas de ADN complementario (ADNC) marcadas con digoxigenina (DIG-11-UTP) son muy utilizadas por su fácil manipulación, rapidez de síntesis, no son radiactivas,

no necesitan equipos ni protección especial, y no son contaminantes.

La hibridación *Dot blot* es una herramienta diagnóstica rápida que permite la manipulación masiva de muestras, y una metodología atractiva para el diagnóstico en programas de saneamiento y certificación de cítricos [5, 9]. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico de viroides en plantas de campo (sin un pasaje previo de amplificación en cidro Etrog) ha proporcionado resultados errados y falsos positivos. Por ejemplo, ensayos en condiciones de baja astringencia y sin agentes desnaturizantes pueden generar falsos positivos o resultados visuales que confundan el diagnóstico [21, 22]. Las observaciones de Wen Xing et al. [23] revelan la posibilidad de interacciones entre sondas ADN viroides con complejos ribonucleoproteicos del hospedero, que provocan señales erráticas en hibridaciones moleculares *Dot blot*. Gómez y Pallás [24] demostraron la formación de posibles complejos ARN-proteína *in vivo* entre el *HSVd* y la lectina proteína 2 del floema en pepino (la proteína más abundante del floema). Estas proteínas podrían provocar una interferencia o unión de las sondas en muestras no infectadas que se analicen mediante *Dot blot* de ARN. Los viroides podrían sufrir modificaciones en la geometría molecular de sus motivos estructurales y potenciar interacciones con proteínas de la planta [25]. Este complejo podría obstruir el acoplamiento de la sonda marcada con el genoma del organismo patógeno. De esta manera, la técnica diagnóstica *Dot blot* se considera poco confiable cuando se aplica en variedades cítricas colectadas de montes comerciales [11, 23].

De acuerdo con Murcia et al. [7], el diagnóstico por hibridación de *Dot blot* puede detectar pequeñas cantidades de ARNvd en material vegetal infectado. Utilizando las sondas de ADNC apropiadas (DIG-ADNC), esta técnica permite discriminar las especies de CVd conocidas, y generar resultados confiables y consistentes. Estos autores propusieron esta estrategia de hibridación molecular para programas de saneamiento, mejora fitosanitaria, cuarentena y certificación, por su elevada sensibilidad y eficiencia.

En este trabajo se analiza comparativamente varios métodos de extracción de ARN viroide a partir de tejido vegetal específico de una variedad cítrica comercial, y se compara la eficiencia en la recuperación de partículas viroides con herramientas moleculares para fines diagnósticos.

Materiales y métodos

Métodos de extracción de ARN

Como control positivo y negativo de infección con *Citrus Exocortis Viroid (CEVd)*, se utilizaron muestras vegetales de plantas de *Citrus limon (L.)* Burm. (variedad Lisbon) con números de acceso K395 y CDL384, crecidas en un monte comercial en Uruguay, respectivamente, de acuerdo con publicaciones previas [26]. Además, como controles positivos y negativos adicionales, este trabajo incluyó muestras de cidro Etrog infectadas con *CEVd* aislado 17 (*CEVd-17*) y cidro Etrog sin infectar, mantenidos en condiciones controladas en el Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Agronomía, Universidad de la República.

2. Flores R, Randles JW, Bar-Joseph M, Diener TO. Viroids. In: van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Carsten EB, Estes MK, Lemon SM, et al., editors. Virus taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego: Academic Press; 2000. p. 1009-24.

3. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. Eur J Plant Pathol. 1999;105(9): 897-903.

4. Barbosa CJ, Pina JA, Navarro L, Duran-Vila N. Replication/accumulation and symptom expression of citrus viroids on some species of citrus and related genera. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. Proceedings XV International Conference of the Organization of Citrus Virologists (IOCV). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologists; 2002. p. 264-71.

5. Cohen O, Batuman O, Stanbekova G, Sano T, Mawassi W, Bar-Joseph M. Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. Virus Genes. 2006;33(3):287-92.

6. Bernard L, Duran-Vila N. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2006;20(2):105-13.

7. Murcia N, Serra P, Olmos A, Duran-Vila N. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. Mol Cell Probes. 2009;23(2):95-102.

8. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. A simple rapid method of nucleic acid extraction without tissue homogenization for detecting viroids by hybridisation and RT-PCR. J Virol Methods. 1999;77(1):47-58.

9. Noronha-Fonseca ME, Marcellino LH, Gander E. A rapid and sensitive dot-blot hybridization assay for the detection of citrus exocortis viroid in Citrus medica with digoxigenin-labelled RNA probes. J Virol Methods. 1996;57(2):203-7.

10. Palacio A, Foissac X, Duran-Vila N. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization: comparison with other detection methods. In: Da Graça JV, Lee RF, Yokomi RK, editors. Proceedings XIV Conference of the International Organization of Citrus Virologist (IOCV). Riverside, CA: International Organization of Citrus Virologist; 2000. p. 294-301.

11. Ito T, Ieki H, Ozaki K. Simultaneous detection of six citrus viroids and Apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. J Virol Methods. 2002;106(2):235-9.

12. Ragazzino E, Faggioli F, Barba M. Development of a one tube-one step RT PCR protocol for the detection of seven viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid. J Virol Methods. 2004;121(1):25-9.

13. Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y, Li Z. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. Eur J Plant Pathol. 2009;124(1):175-80.

14. Tessitori M, Rizza S, Reina A, La Rosa R. Development of a real-time assay for the simultaneous detection of citrus viroids [abstract]. J Plant Pathol. 2004;86(4 Special issue):336.

Para la extracción de ARN, se pulverizaron las cortezas de ramas de 0.1 a 1 cm de diámetro (donde se localiza el tejido floemático), con nitrógeno líquido, mediante un triturador doméstico (Ufesa^{MR}) modificado. La cantidad de tejido pulverizado en todos los métodos de extracción se estandarizó a 5 g y la resuspensión de los ácidos nucleicos se realizó en 300 µL de agua doble desionizada estéril. Los métodos de extracción de ARNvd evaluados para las muestras de tejido de limón fueron:

EVC

El método de extracción viroide convencional (EVC) se diseñó para la obtención de un elevado título viroide de material vegetal específico [27]. El tejido pulverizado se homogenizó en medio de extracción (Tris-HCl 0.4 M, pH 8.9; SDS 1 % (m/v); EDTA 5 mM, pH 7.0; mercaptoetanol 2 % (v/v)) junto con fenol saturado en agua a pH neutro y facilitado mediante agitación en vortex. Se centrifugó a 8000 × g, durante 20 min (a 4 °C), se coleccionó la fase acuosa y se adicionó un décimo del volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.5, y 3 volúmenes de etanol absoluto frío. Se incubó durante 1 h a -20 °C (la precipitación de ácidos nucleicos totales es evidente por floculación de la solución) y se centrifugó a 8000 × g, durante 20 min (a 4 °C). Los ácidos nucleicos totales se dializaron mediante tubos de diálisis (Sigma-Aldrich; 33 mm, membrana de celulosa con retención de moléculas de más de 12 400 PM) en solución TKM 1 × (Tris-HCl 10 mM, pH 7.4; KCl 10 mM; MgCl₂ 0.1 mM). La preparación dializada se sometió a una partición en LiCl 2 M y la fracción soluble se concentró por precipitación con etanol absoluto.

FTG

El método fenol/tiocianato de guanidina se basa en los pasos descritos por Chomczynski y Sacchi [28]. El tejido pulverizado se homogenizó en 15 mL de reactivo TriPure[®] (Roche[™]). Se clarificó el homogenizado por centrifugación, se recuperó el sobrenadante y se separaron las fases con 0.2 mL de cloroformo por cada mililitro de TriPure[®]. El ARN se aisló de la fase acuosa mediante precipitación con 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de TriPure[®] y lavados con etanol al 75 %.

SAP

Método dodecil sulfato de sodio (SDS)/acetato de potasio, descrito por Cañazares et al. [29] con algunas modificaciones. Se homogenizaron 5 g de tejido en tampón de extracción (Tris-HCl 0.1 M, pH 8.9; EDTA 50 mM; NaCl 0.5 M; mercaptoetanol 25 mM). La solución resultante se trató con SDS al 20 % (pH 7.2) e incubó a 65 °C durante 20 min. Se adicionó acetato de potasio 5 M (pH 7.5) e incubó durante 30 min en hielo. La separación de fases se efectuó por centrifugación (15 min a 12 000 × g, 4 °C); se colectó el sobrenadante y se agregaron volúmenes iguales de una solución de polietilenglicol al 20 % y NaCl 1 M, se dejó reposar durante 1 h a 4°C, y centrifugó a 12 000 × g durante 15 min, a 4 °C, con el fin de aislar los ARN de alto peso molecular y recuperar en el sobrenadante los ARN pequeños. Finalmente, se efectuó la precipitación con etanol absoluto.

FS

El método formaldehído/tampón salino de citrato de sodio (SSC) se implementó originalmente para el diagnóstico molecular del viroide PSTVd [30]. Se agregaron 2 mL de tampón de extracción (5× SSC/18.5 % formaldehído) por cada gramo de tejido pulverizado. La solución se homogenizó mediante agitación en vortex con 0.5 volúmenes de fenol saturado en agua (pH 7.0) y 0.5 volúmenes de cloroformo, seguido por centrifugación a 5000 × g durante 5 min, a 4 °C. Se acopió el sobrenadante y se precipitaron los ácidos nucleicos con isopropanol mediante incubación a -20 °C por 1 h. Luego se centrifugó durante 30 min a 3000 × g, a 4 °C, y lavó con etanol al 75 %. Para la extracción de ARN del tejido de cidro de controles infectados y sanos se utilizó el método de EVC.

Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de ADN plasmídico (ADNp), sondas-ADN:DIG, ARN total de hojas de cidro y ARN de tejido del floema de *C. limon* se midió por espectrofotometría UV-visible (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), y se obtuvieron datos de concentración en nanogramos por microlitros. Para evaluar el nivel de pureza de las muestras se calculó el cociente DO_{260/280}. Se consideraron indicativos de pureza óptima los valores mayores que 1.9 para el ARN y mayores que 1.8 para el ADN [31].

Transcripción reversa y amplificación por reacción de polimerización en cadena

Las reacciones se ejecutaron en un termociclador PALM PCR cyclor (Corbett Research). La síntesis de la primera cadena del viroide *CEVd* se desarrolló con el cebador complementario (*CEVd*-R1) 5'-CCGGGA TCCCTGAAGGA-3' [32]. El ARN molde (~200 ng) proveniente de cada método de extracción se desnaturalizó en un primer paso a 85 °C, durante 5 min; posteriormente a 55 °C, durante 1 min junto en 1.25 µM de cebador *CEVd*-R1 (volumen final de 8 µL), seguido de una incubación en hielo, durante 3 min. En el segundo paso de la reacción se sintetizó la primera cadena de ADNc viroide con el empleo de 50 U de RevertAid[™] transcriptasa reversa M-MuLV RNasa H (Fermentas) en una mezcla de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3; MgCl₂ 4 mM; KCl 50 mM; DTT 10 mM (Fermentas); dNTP, 0.4 mM de cada uno) de volumen final de 13 µL, con incubación a 42 °C por 1 h y seguido de un periodo de inactivación enzimática de 3 min a 90 °C. La síntesis de la segunda cadena de ADNc viroide se efectuó en una mezcla de volumen final de 25 µL (4 µL de reacción de la primera cadena, 0.5 U de *Taq*ADN polimerasa (Invitrogen[®]); Tris-HCl 20 mM, pH 8.4; KCl 50 mM, MgCl₂ 1.6 mM; dNTP 0.2 mM y 0.5 µM de cada uno de los cebadores *CEVd*-R1 5'-CCGGGATCCCTGAAGGA-3' y *CEVd*-F1 5'-GGAAACCTGGAGGAAGTCG-3' [32]. Las condiciones de amplificación tuvieron un paso a 94 °C durante 5 min, seguido de 36 ciclos (a 94 °C durante 30 s, a 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 1 min) y un ciclo final a 72 °C durante 5 min.

Elaboración de sondas marcadas por PCR

El marcado del ADNc correspondiente al genoma completo del viroide *CEVd* se efectuó mediante la

15. Navarro B, Darós JA, Flores R. Reverse transcription polymerase chain reaction protocols for cloning small circular RNAs. *J Virol Methods*. 1998;73(1):1-9.

16. Puchta H, Ramm K, Luckinger R, Hadas R, Bar-Joseph M, Sanger HL. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CvIV), a new chimeric viroid present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(23):6640.

17. Rakowski AG, Szychowski JA, Avena ZS, Semancik JS. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *J Gen Virol*. 1994;75(Pt 12):3581-4.

18. Nakahara K, Hataya T, Uyeda I. Inosine 5'-triphosphate can dramatically increase the yield of NASBA products targeting GC-rich and intramolecular base-paired viroid RNA. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(7):1854-6.

19. Eiras M, Rodrigues-Silva S, Sanches-Stuchi E, Penteado-Natividade Targom ML, Alves-Carvalho S. Viroides em citros. *Trop Plant Pathol*. 2009;34(5):275-96.

20. Sieburth PJ, Irey M, Garnsey SM, Owens RA. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. In: Duran-Vila N, Milne RG, Da Graça JV, editors. Proceedings XV Conference of the Internacional Organization of Citrus Virologist (IOCV). Riverside, CA; 2002. pp. 230-9.

21. Ito T, Ieki H, Ozaki K, Iwanami T, Nakahara K, Hataya T, et al. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*. 2002;92(5):542-7.

22. Cañazares M, Marcos J, Pallás V. Molecular characterization of an almond isolate of hop stunt viroid (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *Eur J Plant Pathol*. 1999;105(6):553-8.

23. WenXing X, Ni H, QiuTing J, Farooq AB, ZeQiong W, YanSu S, et al. Probe binding to host proteins: A cause for false positive signals in viroid detection by tissue hybridization. *Virus Res*. 2009; 145(1):26-30.

24. Gómez G, Pallás V. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. *J Virol*. 2004;78(18):10104-10.

25. Rodio ME, Delgado S, Flores R, Di Serio F. Variants of peach latent mosaic viroid inducing peach calico: Uneven distribution in infected plants and requirements of the insertion containing the pathogenicity determinant. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 1): 231-40.

26. Umaña R. Diagnóstico de CBCVd (Cocadviroide) y CvVd-VI (Apscaviroide) en plantaciones cítricas del Uruguay mediante técnicas de detección basadas en hibridación molecular no isotópica. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 2010.

27. Semancik JS, Morris TJ, Weathers LG, Rordorf GF, Kearns DR. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 1975;63(1):160-7.

incorporación por PCR de digoxigenina (DIG-11-dUTP; Roche Molecular Biochemicals) [33]. La mezcla de reacción incluyó 225 pg de plásmido recombinante pGEM[®]-T-Easy-*CEVd* clon 054.11 en solución Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1.6 mM, mezcla de dNTP 0.2 mM (GTP, CTP, ATP), TTP 0.14 mM, 0.5U de *TaqADN* polimerasa (Invitrogen[®]), 1 nmol de DIG-11-dUTP, alcalino-estable y cada uno de los cebadores complementario *CEVd*-R1 y homólogo *CEVd*-F1 a 0.5 μM [34]. Las condiciones de amplificación son las mismas a las descritas en la síntesis de la segunda cadena del ADNc.

Hibridación molecular no isotópica

Para el análisis de Northern blot, el ARN extraído de cada uno de los métodos (alícuotas de 20 μL que corresponden a 333 mg en peso fresco de tejido), se separó por electroforesis (estructura vertical con cristales 10 × 17 cm) en geles de poliacrilamida al 5 %, tampón TAE 1×, en condiciones no desnaturizantes, durante 3 h a 60 mA. Se observó el complejo de ácidos nucleicos totales por tinción con bromuro de etidio y visualización en transiluminador ultravioleta (UV). A los efectos de identificar de forma aproximada la región del gel que contenía ARNvd, se optó por recuperar un fragmento del gel que incluyera los ARN ribosomales 5S y 7S, considerando márgenes de 1 cm superior y 2 cm inferior con respecto al sentido de migración. El segmento del gel recortado se sometió a electrotransferencia (400 mA, tampón TBE 1× durante 1.5 h) a membranas de Nylon cargadas positivamente (Roche Applied Science) [33].

Para los ensayos Dot blot, los ARN de cada uno de los métodos de extracción (6 μL equivalentes a 100 mg en peso fresco de tejido) se pretrataron con 6 μL de formamida, 1.5 μL de 20× SSC e incubaron durante 15 min a 68 °C [34]. La muestra se depositó en membrana Nylon⁺ (Roche Applied Science) y secada a temperatura ambiente (TA). En todos los ensayos de hibridación, la membrana se expuso a un tratamiento de 70 000 μJ/cm² en un horno de entrecruzamiento mediante UV (Hofer-Uvc500, Amersham Biosciences Corp.) para fijar los ácidos nucleicos. La prehibridación (42 °C, 2 h) e hibridación (60 °C toda la noche) se efectuó en una solución de formamida 50 %, tampón 5× SSC (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM; pH 7.0) que contenía SDS 0.02 %, N-laurilsarcosina 0.1 % y solución de bloqueo al 2 % (p/p; Roche Applied Science) [7], con el fin de desestabilizar los puentes de hidrógeno de las cadenas de ácidos nucleicos inmovilizados, a fin de evitar los apareamientos intramoleculares típicos de CVd. Antes de la hibridación, se desnaturizaron las sondas marcadas (690 ng) durante 5 min a 95 °C e inmediatamente colocadas en hielo. Después de la hibridación, las membranas se lavaron dos veces en SSC 2×, SDS 0.1 % a TA durante 15 min y luego incubación a 60 °C durante 1 h en SSC 0.1×, SDS 0.1 %. Por último, se lavó con tampón de lavado (ácido maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 7.5 y Tween 20 al 0.3 % (v/v)), durante 5 min a TA. La membrana se bloqueó con reactivo de bloqueo 1× (Roche Applied Science) durante 40 min a TA. Los híbridos sonda-DIG:ARNvd se detectaron con un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina (fragmento Fab) y tras agregar 0.3 U de anticuerpo por

mililitro de solución de bloqueo 1×. El anticuerpo no unido a la digoxigenina se lavó de la membrana con solución tampón de lavado dos veces, durante 15 min a TA, seguido de una estabilización con tampón de detección (Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M; pH 9.5) durante 30 min. Finalmente, se visualizó los híbridos ARNvd-DIG-Ac-FA mediante la incorporación de sustrato quimioluminiscente CSPD 0.35 mM (Roche Applied Science) por incubación durante 30 min y exposición de placas radiográficas en un casete de revelado durante 20 min, a 37 °C. La luz visible emitida por la defosforilación del CSPD se retuvo por la placa y reveló por autorradiografía. Las señales de hibridación producidas se cuantificaron por análisis densitométrico de la placa revelada utilizando el programa 1 DScan EX versión 3.1 Demo (Scanalytics, Inc.). Se utilizó un método de corrección de segundo plano estimado por la imagen (corrección automática con el mínimo píxel). Las intensidades de señal se reportaron en unidades relativas (UR). Las representaciones gráficas de columnas se desarrollaron con el programa InfoStat[®] versión 2008 *student*.

Resultados y discusión

En una primera etapa, este trabajo comparó la concentración y la pureza del ARN obtenido a partir de cuatro métodos de extracción de ARN total de cortezas de plantas de *C. limon* colectadas en campo. Los métodos EVC y FTG generaron ARN con los mayores valores de pureza (DO_{260/280} entre 1.9 y 2.0), que son niveles bajos en contaminantes, sensibles al UV como las proteínas y el fenol. Además, estos dos métodos mostraron los mayores valores promedio de concentración de ARN total: 2330 ng/μL y 7650 ng/μL, respectivamente. En contraste, las extracciones SAP y FS recuperaron ARN de baja pureza (DO_{260/280} entre 1.3 y 1.5), con concentraciones de ARN de 1217 ng/μL y 2400 ng/μL, respectivamente. En general, el buen rendimiento en la recuperación de ARN a partir de plantas de campo se asociaría a que el tejido muestreado está enriquecido en floema por donde transita el viroide [35]. Resultados similares con cidro Etrog indican que la concentración del viroide *CEVd* en la corteza es 10 veces mayor que en las hojas [36]. No obstante, el elevado título de viroides detectado en el tejido foliar del cidro Etrog se explica por la alta bioamplificación del genoma patógeno en este hospedero sensible.

Las altas concentraciones de ARN extraídas mediante EVC, FTG y FS podrían deberse a que estos métodos aprovechan la eficiencia del fenol para la ruptura de membranas celulares y remoción puntual de proteínas en la fase orgánica. Sin embargo, la concentración de ARN obtenida mediante la metodología FTG es significativamente mayor que para las demás extracciones ensayadas. Probablemente, la ausencia de pasos diferenciales para recuperar sobre todo ARN de bajo peso molecular, resulte en una sobrestimación de la concentración debido a que en la muestra analizada permanece la totalidad del ARN del hospedero.

Es preciso señalar que la pureza del ARN obtenido por FS es muy inferior a la del obtenido por EVC. Ello podría deberse a que el método FS carece de pasos diferenciales de purificación como diálisis y precipitación con LiCl. Por último, la baja concentración

28. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.

29. Cañazares MC, Marcos JF, Pallás V. Studies on the incidence of hop stunt viroid in apricot trees (*Prunus armeniaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Hort.* 1998;472(1):581-7.

30. International Potato Center (CIP). Preparation of 32P-labeled probes by RNA transcription. In: Salazar LF, Jayasinghe U, editors. *Techniques in Plant Virology. Training Manual. Sections 3, 4, 5.* Lima: International Potato Center (CIP); 1997.

31. Manchester KL. Value of A260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. *Bio-Techniques.* 1995;19(2):208-12.

32. Pagliano G, Orlando L, Gravina A. Detección y caracterización del complejo de viroides de cítricos en Uruguay. *Agrociencia.* 1998;1(2):74-83.

33. Mohamed ME, Hashemian SMB, Daffalla G, Bové JM, Duran-Vila N. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *J Plant Pathol.* 2009;91(1):185-90.

34. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.

35. Semancik JS, Tsuruda D, Zaner LJ, Geelen LMC, Weathers LG. Exocortis Disease: Subcellular distribution of pathogenic (viroid) RNA. *Virology.* 1976;69(2):669-76.

36. Li SF, Onodera S, Sano T, Yoshida K, Wang GP, Shikata E. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of return-PAGE and hybridization using DIG-labeled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 1995;61(4):381-90.

y baja pureza del ARN recuperado de la extracción mediante el método de SAP podría deberse a pérdidas en la recuperación del ARN en las etapas de precipitación diferencial con polietilenglicol, a la ausencia de pasos que capturen o discriminen los contaminantes liberados en la pulverización del material con nitrógeno líquido, o a ambos.

En una segunda etapa, se analizó si el método de extracción de ARN afectaba o no la cantidad de *CEVd* detectable mediante tres técnicas de diagnóstico: RT-PCR, *Northern blot* y *Dot blot*. Para ello se analizaron muestras positivas (K395) y negativas (CDL384) para *CEVd*, de plantas *C. limon* (v. Lisbon) acopiadas en el campo, según resultados precedentes [36].

En ARN obtenidos mediante los métodos de EVC y FTG se apreciaron evidencias de amplificación del genoma total de *CEVd* (371 pb) de la planta de limón K395, basados en RT-PCR (Figura 1A). Estos resultados probablemente se deben al elevado nivel de pureza detectado en la muestra y se asocian con los niveles reducidos de inhibidores de las reacciones en cadena de la polimerasa y de transcripción reversa, tales como polisacáridos y polifenoles, los cuales son típicos de la pared celular en tejidos de cítricos. Sin embargo, debido a que el ARN analizado por RT-PCR está altamente diluido (~200 ng), también es posible que el efecto de dilución de las muestras haya disminuido la concentración de potenciales contaminantes que interfieran en la detección del viroide. Las extracciones con los métodos de SAP y FS no mostraron amplicones en el ensayo de RT-PCR (Figura 1B), posiblemente debido a un exceso de moléculas inhibitorias de la actividad enzimática presentes en la extracción. Sin embargo, contrario a lo observado en este estudio, Bernard y Duran-Vila [6] indicaron que la calidad del ARN obtenido de las extracciones de SAP sin modificaciones permitió el análisis por RT-PCR. Posiblemente, las diferencias en el protocolo de extracción, las condiciones de reacción, los cebadores y las enzimas empleadas expliquen esta discrepancia [6, 37].

En el control negativo de cidro Etrog sano se observaron amplicones con pesos moleculares más bajos al esperado (371 pb; Figuras 1A y B, carril E-). Los amplicones de alto y bajo peso molecular podrían deberse al fenómeno de hibridación inespecífica provocado cuando la transcriptasa inversa interactúa con moldes de ARN del hospedero que poseen horquillas termoestables o por el efecto de los ARN nativos que se pliegan sobre sí mismos, lo cual genera un cebador para la transcriptasa reversa [38]. Finalmente, la formación de estructuras secundarias en el genoma viroide al bajar la temperatura de la reacción, podría limitar el acceso de la enzima, y resultar en amplicones de tamaño menores al esperado [15].

La hibridación molecular del ARN viroide por la técnica de *Dot blot* detectó claramente al viroide *CEVd* en la muestra positiva K395 obtenida con el método de EVC, mientras que no se detectaron señales nítidas cuando se utilizaron los otros métodos de extracción (Figura 1E). En las muestras controles negativas no hubo señales. Estos resultados indicarían que la capacidad de detectar la secuencia de ARN del genoma viroide mediante hibridación con sonda ADN-DIG doble hebra se afecta por el método de extracción utilizado.

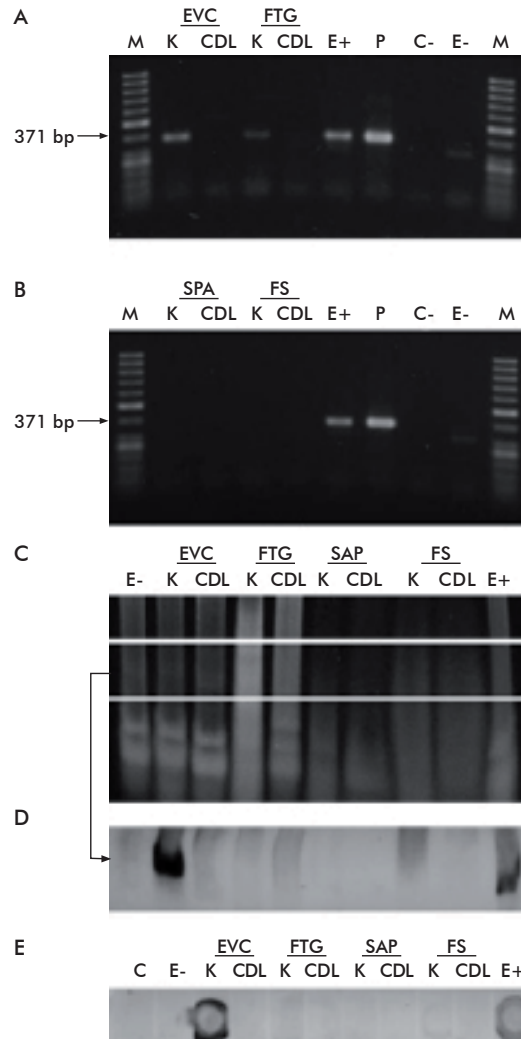


Figura 1. Capacidad de detección de *CEVd* mediante RT-PCR, Northern blot y Dot blot con el empleo de cuatro métodos de extracción de ARNvd: EVC, extracción viroide convencional; FTG, fenol/tiocianato de guanidina; SAP, SDS/acetato de potasio; FS, formaldehído/tampón salino de citrato de sodio. A y B) RT-PCR para *CEVd*. K: limón K395, muestra positiva a *CEVd*. CDL: limón CDL384, muestra negativa a *CEVd*. E+: cidro Etrog infectado con *CEVd*-17. E-: cidro Etrog sano. P: ADNp*CEVd* 054.11. C-: control negativo de la reacción, con mezcla sin ADN molde. M: marcador de peso molecular 50 pb. C) Electroforesis PAGE 5 % y tinción con bromuro de etidio de las muestras correspondientes en A) y B). Se indica la zona del gel recortada que incluye la zona de movilidad de las formas lineal y circular del viroide para su posterior transferencia e hibridación (flecha). D) Autorradiografía de la hibridación Northern blot con sonda de *CEVd*-DIG. E) Hibridación de ARN por Dot blot. Como control negativo (C) se empleó H₂O.

La detección de *CEVd* en *C. limon* mediante la técnica Northern blot-*CEVd*-DIG presentó una señal clara (nivel elevado de saturación, 132 UR) y compacta en la placa radiográfica (Figura 1D) únicamente para ARN extraído con el método EVC (carril K de EVC). En oposición, no se obtuvo evidencia sólida de la presencia de *CEVd* cuando el mismo tejido infectado se procesó con las extracciones FTG, SAP y FS (~30 UR). La alta intensidad de señal observada únicamente para extracciones EVC hasta un punto de saturación podría

37. Wang X, Zhou C, Tang K, Lan J, Zhou Y, Li Z. Preliminary Studies on Species and Distribution of Citrus Viroids in China. *Agric Sci China*. 2008;7(9):1097-103.

38. Tuiskunen A, Leparc-Goffart I, Boubis L, Monteil V, Klingstrom J, Tolou HJ, et al. Self-priming of reverse transcriptase impairs strand-specific detection of dengue virus RNA. *J Gen Virol*. 2010;91(4):1019-27.

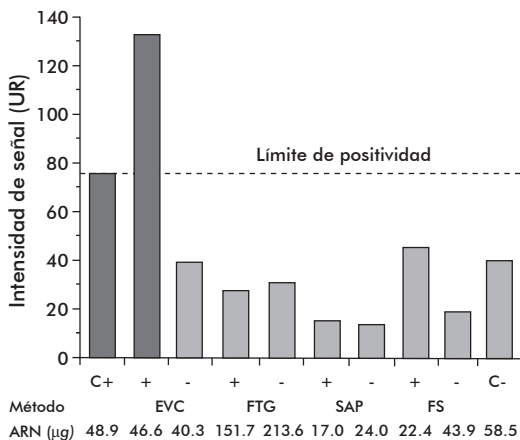


Figura 2. Análisis densitométrico de la intensidad de la señal de la autorradiografía correspondiente a la hibridación *Northern blot* con sonda de CEVd-DIG de muestras positivas (limón K395, +) y negativas (limón CDL384, -) a CEVd. Métodos de extracción: EVC, extracción viroide convencional; FTG, fenol/tiocianato de guanidina; SAP, SDS/acetato de potasio; FS, formaldehído/tampón salino de citrato de sodio. La línea discontinua indica el límite de corte considerado como criterio de positividad (en unidades relativas, UR), que corresponde al doble de la intensidad del control negativo (C-, cidro sano). C+: control positivo, cidro infectado con CEVd-17. Las cantidades de ARN (µg) corresponden al ARN recuperado por cada método de extracción y electrotransferido a la membrana, empleado como material de partida para el ensayo de hibridación *Northern blot*.

deberse a que el título viroide fijado en la membrana y apareado con la sonda CEVd-DIG se elevó (Figura 1D y E, y Figura 2).

La baja intensidad en las hibridaciones moleculares con los otros tres métodos de extracción de ARN podría deberse a una reducida eficiencia en el marcaje de la sonda. En ese caso, la cinética de acoplamiento entre la sonda y el ARNvd se vería limitada por los altos niveles de copias de secuencia homóloga de ARN-CEVd que podrían unirse con sondas complementarias no marcadas. Sin embargo, en este estudio la eficiencia de marcado fue elevada, pues se observó saturación en la intensidad de la señal de *Northern blot* con una mínima cantidad de sonda marcada (690 ng). Los resultados en este estudio se corresponden con los reportados por Murcia *et al.* [7], debido a que la EVC acoplada con detección mediante *Northern blot* se describió como una técnica diagnóstica confiable y robusta para detectar viroides en material de campo.

Es preciso destacar la menor sensibilidad que poseen las hibridaciones moleculares en comparación con la RT-PCR, ya que la extracción FTG no produce señales compactas en la autorradiografía (Figura 1D

y E) y sí revela la presencia de viroide en la RT-PCR (Figura 1A y B).

Similar a lo observado con la técnica de *Dot blot* de ARN, las extracciones mediante SAP, FTG y FS mostraron intensidades de señal significativamente menores a las obtenidas por el método de EVC en hibridaciones de Northern blot, tanto al considerar el ARN del limón infectado como el control positivo de cidro CEVd-17 (Figura 2). La cuantificación de estas señales con sonda específica CEVd-DIG en tejido de floema de *C. limon* evidencia el límite de positividad de la señal (78 UR) o infección (según los parámetros de corrección de fondo estimado por la imagen). Ello se basa en el riguroso criterio de que una muestra infectada debe mantener el doble del mayor valor de la intensidad de la muestra control negativa (39 UR), con el fin de ubicar un intervalo de aceptación para una señal positiva y seguridad de la presencia de título viroide detectable en la muestra [39].

Los resultados de este estudio reflejan que las diferencias en la concentración y pureza de los ARN obtenidos a partir de cuatro métodos de extracción afectan los niveles de ARN viroide detectables mediante tres técnicas de diagnóstico molecular. Utilizando herramientas moleculares de detección basadas en reacciones enzimáticas de amplificación (RT-PCR) e hibridación con sondas de ADNc marcadas, se demostró que en las condiciones experimentales escogidas y utilizando tejidos infectados de variedades cítricas en campo, el método de EVC recupera la mayor cantidad de copias de ARNvd con niveles elevados de pureza.

Se ha descrito que la técnica *Northern blot* es idónea para el desarrollo de ensayos diagnósticos de alta resolución, sensibles y eficientes en la detección de CVd en plantas cítricas en campo, lo cual evita la necesidad de recurrir a una etapa previa de bioamplificación del viroide en plantas indicadoras [7, 33]. Los resultados en este trabajo permiten anticipar que la aplicación de método de EVC-*Northern blot* sería pertinente y factible tanto en pruebas sistemáticas de germoplasma cítrico en un plan de saneamiento de material propagativo, como en prospecciones sanitarias eventuales que tengan como objetivo el control y la erradicación de los viroides cítricos descritos.

Agradecimientos

Se agradece a BID-CONICYT por la financiación del proyecto PDT 74/19. A la Dra. Nuria Duran-Vila por su apoyo y recomendaciones en esta investigación. Al Ing. Agr. Jacques Borde y la Ing. Agr. Ana Bertalmío por ceder los tejidos vegetales controles para este estudio. A la MSc. Paola Gaiero por la revisión crítica del manuscrito.

39. Rodríguez R, Ramos PL, Dorestes V, Velázquez K, Peral R, Fuentes A, *et al.* Establishment of a non-radioactive nucleic acid hybridization technique for Begomovirus detection. *Biotecnol Apl.* 2003;20(3):164-9.

Recibido en octubre de 2012.

Aprobado en diciembre de 2012.