

EMPLEO DE PLANTAS DE PEPINO COMO AMPLIFICADOR BIOLÓGICO PARA LA DETECCIÓN DEL VIROIDE DEL ENANISMO DEL LÚPULO (HSVd) EN CÍTRICOS

Marianela Soto*, Lien González**, Esther Lilia Peralta*** y R. Pérez***

*Dirección de Protección de Plantas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

Correo electrónico: msoto@censa.edu.cu; **Facultad de Biología, Universidad de La Habana, calle 25 e/ H y J, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba; ***Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), Ave 7^{ma} no. 3005 e/ 30 y 32, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

RESUMEN: El viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) es el agente causal de la cachexia de los cítricos, enfermedad que puede ocasionar pérdidas importantes en este cultivo. En Cuba se ha informado la presencia del HSVd en cítricos en un alto porcentaje de plantas y se dispone de métodos de detección basados en ensayos biológicos en plantas y su combinación con el análisis de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e hibridación de ácidos nucleicos. Estos métodos involucran un paso previo de inoculación en un amplificador biológico cítrico, a partir del cual se analizan los ácidos nucleicos, lo cual impone como limitante el requisito de al menos tres meses de incubación. El objetivo del presente trabajo ha sido desarrollar una metodología para la detección de las variantes de secuencias del HSVd presentes en cítricos mediante el empleo de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. var. Japonés) como amplificador biológico intermedio que supera en rapidez al existente en la actualidad sin detrimento de su eficacia. Para ello se evaluaron controles positivos de plantas de cítricos provenientes de campo. Los resultados definieron una metodología para el diagnóstico del HSVd en plantas cítricas provenientes de campo en la que se combina la amplificación biológica intermedia en plantas de pepino y la detección mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Esta metodología presentó una eficacia de un 98.9% y requirió un tiempo de replicación del viroide en la planta de 14 días, el cual resulta inferior al de la metodología empleada actualmente. Su empleo podría disminuir el tiempo para la toma de decisiones de medidas de control y el período de riesgo, aspectos de gran relevancia para los servicios especializados que garantizan la calidad fitosanitaria del material de propagación.

(Palabras clave: HSVd; viroide; detección; NASH; cítricos)

USE OF CUCUMBER PLANTS FOR THE DETECTION OF HOP STUNT VIROID (HSVd) IN CITRUS

ABSTRACT: Hop stunt viroid (HSVd) is the etiological agent of citrus cachexia and it can cause considerable losses in this crop. In Cuba, HSVd has been reported occurring in a high percentage of plants in different citrus areas, and works concerning its detection have been mainly based on biological assays and their combination with nucleic acid analysis by polyacrilamida gel electrophoresis and nucleic acid hybridization. These methods involve a previous step of inoculating a citrus biological amplifier before nucleic acids can be analyzed. It imposes a restrictive requirement of incubation for at least three months. The objective of the present work was to develop a new methodology for detecting HSVd in citrus plants using cucumber plants (*Cucumis sativus* L. var. Japanese) as an intermediate biological amplifier that requires a shortest incubation time than the amplifier presently used without affecting its effectiveness. Positive citrus plants controls from field were evaluated and compared with reference methods. The results defined a methodology for HSVd diagnosis in citrus where the intermediate biological amplification in cucumber plants is combined with detection by nucleic acid hybridization. This methodology showed an effectiveness of 98.9% and required a replication time of the viroid in the plant of 14 days, shorter than that presently required. Its use could diminish the time of decision taken of control measures and the risk period, both aspects that are of great importance for the specialized services that guarantee the propagation material phytosanitary quality.

(Key words: HSVd; viroid; detection; NASH; citrus)

INTRODUCCIÓN

Los viroides son las entidades patogénicas más simples descritas hasta el momento, capaces de afectar sólo a plantas superiores (4, 5, 6, 7, 8, 23). Estas moléculas están compuestas únicamente por una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN, 246-401 nucleótidos), cerrada covalentemente y con una alta complementariedad interna, lo cual determina su estructura secundaria mayoritariamente en forma de varilla (19). Otra de sus características excepcionales es la ausencia de marcos de lectura abiertos, lo cual los clasifica como moléculas de ARN no codificantes y los convierte en la forma más elemental de parasitismo, pues dependen de los mecanismos celulares para el desarrollo de sus ciclos replicativos, incluso, de la maquinaria de transcripción de ARN (7). A pesar de su simplicidad, los viroides son capaces de replicarse autónomamente en células susceptibles, mostrar especificidad por el hospedante, moverse de célula a célula y a larga distancia, y son capaces de inducir efectos patogénicos específicos en sus hospedantes (9).

En cítricos se ha identificado la presencia de cinco especies de viroides (1) y más recientemente se ha descrito una nueva especie informada solamente en Japón, identificada con las siglas CVd-OS (del inglés *viroid citrus*, en muestras llamadas OS) (9). De estas especies sólo dos son causantes de enfermedades bien caracterizadas hasta el momento: la exocortis de los cítricos (causada por el viroide de igual nombre, CEVd) y la cachexia de los cítricos (ocasionada por un tipo de variante del viroide del enanismo del lúpulo, HSVd) (3). El resto de las especies descritas provocan síntomas muy leves, generalmente relacionados al enanismo y en la mayoría de los casos no provocan síntoma alguno (1, 9, 13).

En Cuba se ha informado la presencia del HSVd en cítricos con un alto porcentaje de plantas en diferentes zonas cítricas (17, 18, 25) y durante años el Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT) ha desarrollado un importante trabajo en la caracterización biológica de aislados cubanos de cítricos que contienen a este viroide (17, 18). Sin embargo, desde el punto de vista molecular, no se tiene información sobre las variantes de secuencias del HSVd presentes en estos aislados. También se ha trabajado con métodos de detección basados en ensayos biológicos (17, 18) y su combinación con el análisis de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e hibridación de ácidos nucleicos (24). Estos métodos involucran necesariamente un paso previo de inoculación en un amplifica-

dor biológico cítrico (11, 24) a partir del cual se analizan los ácidos nucleicos, lo cual impone como limitante el requisito de al menos tres meses de incubación.

En la actualidad, la citricultura en Cuba está efectuando un proceso de sustitución y diversificación de patrones de cítricos como parte de las medidas de manejo y control del complejo virus de la tristeza de los cítricos-*Toxoptera citricida* K. Los nuevos patrones, sin embargo, resultan en su mayoría susceptibles a las enfermedades provocadas por viroides (14, 21). En este sentido, la búsqueda de procedimientos rápidos y eficaces, que permitan el análisis rutinario de un gran número de muestras para su aplicación en el sistema de producción de material certificado es una de las líneas de trabajo a seguir.

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar una nueva metodología para la detección de las variantes de secuencias del HSVd presentes en el cultivo de los cítricos, mediante el empleo de plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. var. Japonés) como amplificador biológico intermedio, y la posterior hibridación de los ácidos nucleicos para su detección, que supere en rapidez al existente en la actualidad sin detrimento de su eficacia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de ácidos nucleicos

En todos los ensayos realizados se utilizaron dos tipos de material vegetal a partir de cítricos: plantas de toronjo (*Citrus paradisi* Macf. var. Marsh.) injertado sobre *Citrus macrophylla* Wester provenientes de un campo en el que previamente se determinó la presencia de cachexia en porcentajes elevados (16) y plantas del patrón *Citrus volkameriana* Ten y Pasq., inoculadas con aislados que contenían a CVd-IIb en ensayos realizados en la Unidad Científica Técnica de Base (UCTB) en Jagüey Grande, Matanzas. Se emplearon además plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. var. Japonés), las cuales se mantuvieron en casas de malla. Como controles negativos se emplearon plantas sanas de Clemelín 11-20, *Citrus clementina* Hort. Ex Tan. X *Citrus sinensis* (L.) Osb., injertadas sobre cidro (*Citrus medica* L.), plantas de cidro y de pepino var. Japonés.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó siguiendo el método descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12). Para ello se analizaron 5 g de tejido vegetal de tallos y hojas jóvenes y se homogeneizaron en un volumen de 5 mL de tampón de extracción (tris hidroximetil aminometano (Tris-HCL) 0.4M, pH 8.9; sal sódica de dodecilo sulfato (SDS) 1% (p/v); ácido

etilendiamino-tetra-acético (EDTA) 5 mM, pH 7.0; b-mercaptoetanol 4% (v/v) y 15 mL de fenol saturado en agua). Los ácidos nucleicos totales se fraccionaron en cloruro de litio (LiCl) 2 M y la fracción soluble se concentró por precipitación con etanol, y se resuspendió en 100 μ L de tampón TKM (Tris-HCl 10mM; cloruro de potasio, KCL 10mM; cloruro de magnesio, MgCl₂ 0.1mM; pH 7.4).

Inoculación en plantas de pepino y extracción de ácidos nucleicos

Los extractos obtenidos a partir de las plantas de cítricos se utilizaron para inocular plantas de pepino. La inoculación se realizó cuando las plantas contaban con la primera hoja verdadera y el procedimiento de inoculación fue mecánico, provocando pequeñas heridas en el tallo de la planta con el uso de una cuchilla previamente desinfectada en solución de hipoclorito de sodio al 1%. Sobre estas heridas se aplicaron 10 μ L del extracto que contenía al inóculo y se cubrieron con varias capas de cinta plástica adhesiva. Las plantas se mantuvieron en condiciones de casas de malla, y la extracción de ácidos nucleicos se realizó a los 9, 14 y 21 días posinoculación. En cada momento se analizaron muestras foliares superiores e inferiores.

Por cada extracto a evaluar se inocularon dos plantas de pepino. Como controles negativos se emplearon plantas no inoculadas, las cuales conjuntamente con las plantas inoculadas, se mantuvieron en condiciones de casa de malla a temperatura ambiente, por un período de 25 días, y durante este tiempo se observó la posible aparición de síntomas. La extracción de ácidos nucleicos se realizó según el procedimiento descrito por Querci *et al.* (20), el que fue modificado. Este procedimiento fue descrito inicialmente para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) mediante la hibridación de ácidos nucleicos, y como principio se basa en la extracción directa de los ácidos nucleicos totales con el empleo de un tampón que contiene formaldehído para evitar el paso de desnaturalización previa a la hibridación de ácidos nucleicos. Para ello se partió de 0.5 g de tejido foliar, a los cuales se les añadió 1 mL de solución de extracción (formaldehído 18.2 % y SSC 5.06X) (NaCl 0.7 M y citrato de sodio 0.07 M) y se maceraron en mortero. Luego se transfirió el homogeneizado a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 5 minutos a 12 000 rpm a temperatura ambiente, y la fracción soluble se traspasó a un nuevo tubo de microcentrífuga. En este caso se obvió el tratamiento con fenol, así como la posterior precipitación con etanol, lo cual constituyó la modificación realizada al

procedimiento original. Las preparaciones de ácidos nucleicos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Detección del HSVd mediante hibridación de ácidos nucleicos (NASH)

Los extractos de ácidos nucleicos se aplicaron sobre membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), utilizando un equipo en formato de *dot-blot* conectado al vacío (Schleider & Schuell, modelo SRC-96/1). Las membranas se expusieron a 80°C durante dos horas para fijar los ácidos nucleicos. En el caso de los extractos de las plantas cítricas, previo a la aplicación en la membrana se desnaturalizaron 20 μ L de estos en una solución que contenía 12 μ L de SSPE 20X (cloruro de sodio, NaCl 2.9 M; di-hidrógeno fosfato de sodio mono-hidratado, NaH₂PO₄H₂O 0.1 M; EDTA 19.8 mM) y 8 μ L de formamida, se mantuvieron a 60°C durante 15 minutos y posteriormente se incubaron cinco minutos en hielo. Los extractos de las plantas de pepino se aplicaron directamente sobre la membrana (100 μ L de la fase acuosa).

Como controles positivos para los ensayos de NASH se utilizaron plásmidos que contenían un inserto monomérico del HSVd. Previo a su aplicación sobre las membranas, estos se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100°C y luego se mantuvieron en hielo.

La sonda de ácidos nucleicos utilizada consistió en un fragmento de ADN de doble cadena, correspondiente a un monómero del HSVd al cual se le incorporó la digoxigenina (DIG, Roche) como marcador no radiactivo. El método de marcaje empleado consistió en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según describe Palacio-Bielsa *et al.* (12), en el que se añadió al contenido de la mezcla de la reacción además, 5 mM de dUTP-DIG (Roche). La concentración de ADN se determinó mediante la medida de la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda (Ultraspéc 2100 pro, Amersham Pharmacia Biotech) (22).

La NASH se realizó según lo describe Palacio-Bielsa *et al.* (12). Para la prehibridación se añadieron, por cada 100 cm² de membrana, 10 mL de una solución que contenía 50% formamida; 0.5% SDS; 6X SSPE (0.87 M NaCl; 0.03 M NaH₂PO₄H₂O; 5.94 mM EDTA pH 7.4), solución Denhardt 5X (0.1% Ficoll; 0.81% polivinilpirrolidona; 0.1% albúmina de suero bovino) y 10 mg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor. Las membranas se mantuvieron en esta solución a 50°C durante dos horas.

La hibridación se realizó añadiendo, por cada 100 cm² de membrana, 10 mL de una solución que contenía 50% formamida; 5% SDS; 6X SSPE (0.87 M NaCl; 0.03 M NaH₂PO₄·H₂O; 5.94 mM EDTA pH 7.4), 10 mg de ADN de esperma de salmón y 10 mg de sonda de ADN marcada con DIG. Tanto el ADN de esperma de salmón como la sonda se desnaturalizaron por calor previo a ser aplicados a la solución de hibridación. Las membranas se mantuvieron hibridando durante 16 horas a 50°C.

Al concluir el tiempo de hibridación se realizaron dos lavados a temperatura ambiente durante 15 min. en SSC 2X (0.29 M NaCl; 0.03 M citrato de sodio, pH 7) y 0.1% SDS, y un lavado a 60°C por una hora con SSC 0.1X (0.014 M NaCl; 1.5 mM citrato de sodio, pH 7) y 0.1% SDS.

La detección de los híbridos marcados se realizó por un método quimioluminiscente, con el empleo de un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina (fragmentos Fab), siguiendo el procedimiento descrito por el productor (Boehringer Manneheim). Como sustrato de la enzima se utilizó el compuesto quimioluminiscente CSPD (3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)triclo[3.3.2.1^{3,7}]decan}-4-il) fenil fosfato (Roche). La visualización de los híbridos se realizó mediante la exposición de láminas X-omat (Kodak) a 37°C durante 1 hora.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la toma de muestras y el tiempo posinoculación sobre la intensidad de señal de la NASH en la detección del HSVd. En tal sentido, se analizaron plantas de pepino inoculadas con extractos de ácidos nucleicos a partir de 15 plantas de cítricos provenientes de campo y 14 del patrón *C. volkameriana*. En el caso de estas últimas, se tomó como fuente de inóculo material vegetal de diferentes zonas de la planta (inferior, medio y superior). Para determinar la influencia del tiempo posinoculación (PI) en relación con la posición de la hoja de las plantas de pepino inoculadas, los extractos de ácidos nucleicos fueron analizados por hibridación de ácidos nucleicos a los 9, 14 y 21 días PI, y en todos los casos se muestrearon las hojas inferior y superior verdaderas de cada planta.

Para el análisis de los resultados de las plantas de pepino inoculadas con los extractos de ácidos nucleicos de cítricos provenientes de campo, se determinó la intensidad de la señal de NASH mediante la medida de la densidad óptica, utilizando un densitómetro (BIORAD) y el programa Molecular Analyst (BIORAD, versión 4.1.2). Los valores obtenidos se compararon mediante una prueba *t* de Student de muestras independientes (1). En el caso de las

plantas de pepino inoculadas con extractos de plantas de *C. volkamerina* se compararon las fuentes de inóculo que resultaron positivas mediante una prueba de comparación múltiple de proporciones (2).

A partir del análisis de los resultados obtenidos se definieron las condiciones del ensayo que permitieron una mejor detección del viroide y se elaboró una propuesta de metodología de diagnóstico.

Comparación de la metodología propuesta con métodos de referencia para la detección del HSVd

La comprobación de los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta se realizó a partir de 15 muestras de cítricos empleando dos métodos de referencia. En el primero de los métodos de referencia (16, 24), cada muestra de campo fue inoculada por injerto en dos plantas de Clemelín 11-20 injertadas sobre cidro, las cuales se mantuvieron en condiciones de casa de mallas durante seis meses. Después de este tiempo se evaluó la presencia de síntomas típicos de cachexia (18) y se les realizó la extracción de ácidos nucleicos (12) para su posterior análisis por NASH siguiendo el procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12).

En el segundo método de referencia, luego de la inoculación en las plantas de Clemelín 11-20 como se describió anteriormente, la detección del HSVd se realizó mediante la reverso transcripción combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), de acuerdo al procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12). La síntesis del ADN del fragmento esperado (aproximadamente 300pb) se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Tris-HCl 0.04M; EDTA 1 mM; ácido bórico 0.04 M; pH 8), a 100V de voltaje constante. El ADN se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta mediante tinción de los geles con bromuro de etidio (22).

Paralelamente, las muestras fueron analizadas mediante la metodología de diagnóstico propuesta en este trabajo. Para ello se tomaron 5 g de material vegetal de diferentes zonas de las plantas de cítricos, incluyendo la zona inferior, y se les realizó la extracción de ácidos nucleicos según lo descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12). Los extractos obtenidos se inocularon de manera mecánica en plantas de pepino de la variedad Japonés cuando contaban con la primera hoja verdadera. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de casa de malla y a los 14 días posinoculación (PI) se analizaron muestras de las hojas superiores para realizar la extracción de los ácidos nucleicos totales por el procedimiento modificado de Querci *et al.* (20). Se realizó la NASH en forma-

to *dot blot*, con sonda de ADN específica del HSVd marcada con digoxigenina, siguiendo el procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12). La evaluación de las señales de hibridación se realizó de manera cualitativa, según la presencia o ausencias de manchas oscuras definidas en las películas de rayos X (X-omat, Kodak).

Evaluación de los parámetros de desempeño

El límite de detección de la NASH a partir de los extractos de las plantas de pepino previamente inoculadas con muestras de campo se evaluó mediante diluciones seriadas de estos: muestra pura, 1:10, 1:100 y 1:1000. Las evaluaciones se realizaron con cuatro controles positivos.

Para la definición de los parámetros de desempeño se evaluaron 52 controles positivos y 44 controles

negativos (Tabla 1), con cuyos resultados se calcularon los parámetros de desempeño del ensayo siguiendo la metodología establecida por Peralta y Villoch (15).

RESULTADOS

Las muestras foliares de las plantas de pepino inoculadas con los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de cítricos provenientes de campo, mostraron señales de hibridación específicas para el HSVd en todos los tiempos PI analizados. Estos resultados indican no sólo la replicación del viroide, sino su movimiento dentro de la planta y el éxito de la inoculación en plantas de pepino a partir de muestras cítricas de campo. Los valores de densidad óptica obtenidos en la señal de hibridación para cada tipo de hoja muestreada en los diferentes tiempos se presentan en la Figura 1.

TABLA 1. Descripción de los controles empleados para la determinación de los parámetros de desempeño de la metodología propuesta para la detección del HSVd en cítricos./ *Description of the controls used for the determination of validation parameters of the methodology proposed for the detection of HSVd in citrus*

Controles positivos		Controles negativos	
Descripción de controles	Cantidad	Descripción de controles	Cantidad
<i>C. paradisi</i> var. Marsh./ <i>C. macrophylla</i>	17	Clemelín 11-20/ <i>C. medica</i>	15
<i>C. volkameriana</i>	35	<i>C. medica</i>	5
		<i>C. sativus</i> var. Japonés	24
Total	52	Total	44

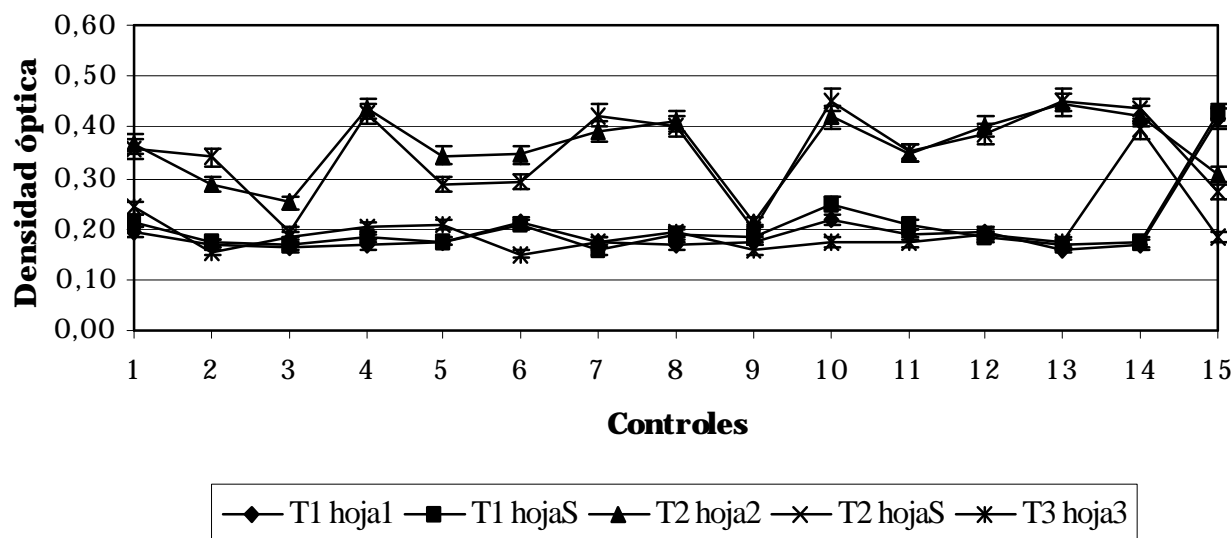


FIGURA 1. Valores medios de densidad óptica para las señales de NASH a diferentes tiempos y hojas muestreadas de las plantas de pepino inoculadas con extractos de ácidos nucleicos de 15 plantas de cítricos portadoras del HSVd provenientes de campo. T1: 9 días posinoculación (PI); T2: 14 días PI; T3: 21 días PI; S: hoja superior./ *Average of NASH signal optical density values at different times and surveyed leaves of cucumber plants inoculated with nucleic acid extracts of 15 citrus plants carrying field HSVd isolates. T1: 9 post inoculation days (PI); T2: 14 PI days; T3: 21 PI days; S: higher leaf.*

Puede apreciarse de manera general que las señales de hibridación fueron más fuertes en las muestras analizadas a los 14 días de la inoculación, ya fuese en las hojas verdaderas primeras o superiores. La prueba *t* de Student reveló que no existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la señal obtenida para las diferentes hojas en el mismo tiempo de muestreo, en cada réplica de las plantas de pepino analizadas. Para cada comparación realizada el valor del estadígrafo *t* se mostró en el rango de 2.77 a 4.30.

El porcentaje de detección en las muestras foliares inferiores fue del 93,6, 100 y 100 % para los análisis realizados a los 9, 14 y 21 días posinoculación, respectivamente. Mientras que fue positiva en el 100% de las muestras evaluadas de hojas verdaderas superiores a los 9 y 14 días. A los 21 días aunque fue posible detectar la presencia del HSVd sólo se pudo muestrear una hoja debido al deterioro de las plantas.

Al analizar las plantas de pepino inoculadas con los extractos de *C. volkameriana* se detectó la presencia del HSVd con diferencias en las proporciones de detección en función de la zona de la planta de cítrico empleada para la inoculación, la hoja de pepino muestreada y el tiempo PI en el que fueron analizadas.

La Tabla 2 muestra que la detección del HSVd a partir de los extractos de la primera hoja verdadera

de las plantas de pepino inoculadas no difirió significativamente en relación a la región de la planta de *C. volkameriana* que se utilizó como inóculo, ni al tiempo posinoculación en el que se analizaron las plantas de pepino. Sin embargo, cuando se analizaron las hojas verdaderas superiores de las plantas de pepino inoculadas se observaron diferencias significativas. En este caso, cuando la fuente de inóculo correspondió a la región inferior de las plantas de *C. volkameriana* y el análisis de los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de pepino se realizó a los 14 días PI, se detectó la presencia del HSVd en el 100% de los inóculos. Este valor no difirió significativamente de los obtenidos a los 9 y 14 días PI en el caso en que el inóculo provino de la zona media de las plantas de cítricos, pero mostró diferencias significativas con el resto de los casos comparados (Tabla 3).

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la detección del HSVd en las plantas de *C. volkameriana* según la región de la planta utilizada como fuente de inóculo para las plantas de pepino y el tiempo posinoculación de estas en las que se analizan los extractos de ácidos nucleicos mediante NASH, se determinó que las condiciones de muestreo que permitieron obtener mejores resultados fueron las hojas superiores a los 14 días posinoculación, similar a lo observado cuando el inóculo provino de plantas de cítricos de campo.

TABLA 2. Proporción de controles de *C. volkameriana* empleados como inóculos en los que se determinó la presencia del HSVd mediante la NASH en la primera hoja verdadera de plantas de pepino a diferentes tiempos posinoculación con extractos de diferentes regiones de la planta./ *Proportion of C. volkameriana controls used as inocula in which the presence of HSVd was determined by NASH in the first true leaf of cucumber plants at different post inoculation times*

Región de la planta de <i>C. volkameriana</i> que se tomó como inóculo	9 días posinoculación	14 días posinoculación
Inferior	0.78	0.85
Medio	0.71	0.64
Superior	0.71	0.71

TABLA 3. Proporción de controles de *C. volkameriana* empleados como inóculos en los que se determinó la presencia del HSVd mediante la NASH en la hoja verdadera superior de plantas de pepino a diferentes tiempos posinoculación con extractos de diferentes regiones de la planta./ *Proportion of C. volkameriana controls used as inocula in which the presence of HSVd was determined by NASH in the superior true leaf of cucumber plants at different post inoculation times*

Región de la planta de <i>C. volkameriana</i> que se utilizó como inóculo	9 días posinoculación	14 días posinoculación
Inferior	0.78 ^{ab}	1.00 ^a
Medio	0.57 ^b	0.92 ^{ab}
Superior	0.71 ^b	0.71 ^b

* Proporción con letras diferentes indican diferencias significativas para $p < 0.05$ (ES = 0.044).

A partir de los resultados obtenidos en la detección del HSVd en plantas de cítricos provenientes de campo y del patrón *C. volkameriana* se propone una metodología en la cual se emplea la planta de pepino como amplificador biológico intermedio:

Metodología propuesta para la detección del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) en muestras cítricas de campo con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio y posterior análisis por hibridación de los ácidos nucleicos

1- Extracción de muestra de las plantas cítricas de campo

Se deben extraer ramas jóvenes de la planta de diferentes zonas, incluyendo en ellas la región inferior. Las muestras debidamente identificadas se llevarán al laboratorio para su procesamiento.

2- Extracción de los ácidos nucleicos de las plantas de cítricos e inoculación en plantas de pepino.

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizará fundamentalmente la corteza de los tallos, y el procedimiento se hará según el descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (12) a partir de 5 g de material vegetal. El extracto final puede conservarse a -20°C hasta su utilización.

La inoculación en plantas de pepino (*C. sativus* var. Japonés) se realizará cuando las plantas cuenten con la primera hoja verdadera, provocando pequeñas heridas en el tallo de la planta, con el uso de una cuchilla previamente desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 1%. Sobre estas heridas se aplicarán 10 µL del inóculo, y se cubrirán con varias capas de cinta plástica adhesiva. Por cada extracto a analizar se inocularán dos plantas de pepino. Las plantas se mantendrán en condiciones de casa de malla, a temperatura ambiente.

3- Toma de muestras de las plantas de pepino y extracción de ácidos nucleicos.

A los 14 días posinoculación se extraerán hojas de las plantas de pepino, preferiblemente de la parte superior. La extracción de ácidos nucleicos se realizará según el procedimiento modificado de Querci *et al.* (20).

4- Realización de la hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas al HSVd.

La fase acuosa de los extractos se aplicará directamente sobre membranas de nylon cargadas positivamente y se fijarán por exposición a 80°C durante dos horas. Se deberán incluir al menos dos controles positivos y dos negativos.

El procedimiento de hibridación se realizará según describe Palacio-Bielsa *et al.* (12) empleando una sonda de ADN específica al HSVd marcada con digoxigenina obtenida mediante PCR. Luego de 16 horas de hibridación se realizarán los lavados descritos en dicho protocolo y la detección de los híbridos usando un sustrato quimioluminiscente.

5- Análisis de los resultados.

La evaluación de los resultados se realizará de manera cualitativa: en las posiciones donde aparezca una mancha de señal de hibridación se considerará como positiva (en comparación con los controles positivos y negativos). Las plantas que resulten positivas serán debidamente eliminadas.

Comparación de la metodología propuesta con métodos de referencia para la detección del HSVd

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos en la detección del HSVd en 15 muestras de cítricos provenientes de campo, mediante dos métodos de referencia y la metodología propuesta en este trabajo (inoculación en plantas de pepino y detección por hibridación de ácidos nucleicos).

TABLA 4. Resultados de la detección del HSVd a partir de muestras de cítricos provenientes de campo mediante dos métodos de referencia y el propuesto (inoculación en plantas de pepino y posterior análisis por NASH). Los valores indican la cantidad de muestras consideradas positivas./ *Results of the detection of HSVd from samples of citrus from field by two reference methods and that proposed (inoculation in cucumber plants and posterior analysis by NASH). Numbers indicate the quantity of samples considered as positive*

		Síntomas	Detección de ácidos nucleicos del HSVd
Métodos de referencia ¹	Clemelín 11-20-NASH	7/15 ²	15/15
	Clemelín 11-20-RT-PCR	7/15	15/15
Método propuesto	Pepino-NASH	0/15	15/15

¹Métodos referidos (16; 24).

²El denominador refiere el total de plantas de cítricos provenientes de campo analizadas.

Los resultados obtenidos por los métodos de referencia ensayados mostraron la presencia del HSVd en las 15 muestras analizadas. En ambos ensayos la utilización de la planta indicadora Clemelín 11-20 permitió identificar la existencia de variantes tipo CVd-IIb en siete de las 15 muestras analizadas, las cuales mostraron síntomas específicos de cachexia (Fig. 2). Esto indica que en las muestras que no indujeron síntomas a la planta indicadora estaban presentes variantes tipo CVd-IIa o intermedias, ya que se ha comprobado previamente que en Clemelín 11-20 no tiene lugar el fenómeno de interferencia entre CVd-IIa y CVd-IIb referido para cidro Etrog Arizona 861 S-1 (16).



FIGURA 2. Síntomas de acumulación de goma inducidos en plantas de Clemelín 11-20 por la presencia de variantes del HSVd causantes de cachexia en una de las muestras analizadas. Se señala la acumulación de goma en la zona donde se descortezó para la evaluación de los síntomas./ *Gumming symptoms induced in Clemelin 11-20 plants caused by HSVd variants causing cachexia. Gumming is observed in the unbarked area for further symptom evaluations.*

El análisis de las 15 muestras de campo mediante el método propuesto en el cual se combina el empleo de plantas de pepino como amplificador intermedio y posterior análisis por hibridación de ácidos nucleicos, permitió detectar al HSVd en la totalidad de ellas. La comparación de este método con los resultados obtenidos por los de referencia indicó un 100% de coincidencia entre ellos.

En el caso del método que se evalúa no se observó la aparición de síntomas en las plantas de pepino inoculadas, por lo que a través de la sintomatología no se pudo discriminar entre variantes patogénicas o no.

Evaluación de los parámetros de desempeño

El límite de detección obtenido en la hibridación de ácidos nucleicos al evaluar los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de pepino inoculadas fue de 1:10. Por su parte, los resultados en la evaluación de los controles positivos y negativos por la metodología propuesta y los parámetros de desempeño determinados sobre la base de estos resultados, se muestran en las Tablas 5 y 6.

TABLA 5. Valores básicos para estimar los parámetros de desempeño de la detección del HSVd mediante NASH con el uso de las plantas de pepino como amplificador biológico intermedio./ *Basic values to estimate the validation parameters for HSVd detection by NASH using cucumber plants as intermediate biological amplifier*

		Controles de referencia	
		Infectados	Sanos
Resultados de la NASH a partir de extractos de pepino inoculados	+	51 Vp	0 Fp
	-	1 Fn	44 Vn

TABLA 6. Parámetros de desempeño determinados para la detección del HSVd mediante la metodología propuesta./ *Validation parameters determined for HSVd detection using the methodology proposed*

Parámetros	NASH
Especificidad diagnóstica (D-SP)	100%
Sensibilidad diagnóstica (D-SN)	98.0%
Eficacia (E)	98.9%
Valor predictivo de positividad (Vpp)	100%
Valor predictivo de negatividad (Vpn)	97.7%

El método establecido, en el cual se utiliza la planta de pepino variedad Japonés como amplificador biológico para la posterior detección del HSVd mediante la NASH, mostró una eficacia de 98.9%.

DISCUSIÓN

La detección del HSVd en plantas de pepino var. Japonés inoculadas con extractos de ácidos nucleicos de plantas de cítricos que contenían a este viroide,

mostró que este hospedante puede utilizarse como amplificador biológico intermedio para lograr niveles detectables de este mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Las evaluaciones realizadas permitieron definir que las mejores condiciones fueron cuando el muestreo de las plantas de pepino se realizó a los 14 días luego de la inoculación con extractos a partir de muestras cítricas de campo. En dicho momento se pudieron analizar tanto las hojas verdaderas inferiores como las superiores, sin que existiesen diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, aunque en estos experimentos se determinó la fortaleza de la señal de hibridación en cada caso mediante la medición de la densidad óptica, para los ensayos rutinarios es suficiente su evaluación cualitativa, ya que pudo constatar la coincidencia entre la presencia de señal visible y la identificación de muestras positivas según los valores de densidad óptica.

La evaluación de diferentes zonas de las plantas de *C. volkameriana* como fuente de inóculo para las plantas de pepino confirmaron la distribución irregular del HSVd en las especies cítricas, lo cual ha sido mencionado con anterioridad por Velázquez (24), e indicaron la conveniencia de incluir muestras de la zona inferior de la planta para la conformación del inóculo y la utilización de hojas superiores de las plantas de pepino a los 14 días posinoculación para la detección del HSVd.

La ausencia de síntomas en las plantas de pepino inoculadas no permitió determinar el tipo de variante que estaba presente en las muestras. Esto limita la utilidad que pudiera tener para la caracterización biológica de aislados de viroides de cítricos, sin embargo, no afecta su valor para la detección del HSVd, ya sea de las variantes CVd-IIa o CVd-IIb, pues fue capaz de replicar a ambos, en lo que mostró un 100% de coincidencia con los métodos de referencia comparados. A pesar de que las variantes CVd-IIa no están asociadas a enfermedades, la estrategia que se sigue en la obtención de material de multiplicación de los cítricos es que este se encuentre libre de viroides (16). Por lo tanto, la metodología propuesta en este trabajo cubre dicho requerimiento.

Una de las premisas fundamentales para el manejo de las enfermedades ocasionadas por viroides es la obtención y utilización de material de propagación certificado, aspecto en el cual la disponibilidad de métodos de diagnóstico eficaces resulta fundamental. Los métodos de referencia y disponibles para el diagnóstico del HSVd requieren al menos de tres meses posinoculación para su detección mediante el análisis de los ácidos nucleicos. En cambio, los resultados obte-

nidos en este trabajo permitieron obtener una metodología en la cual se detecta al HSVd a los 14 días, luego de la inoculación. Los altos valores de los parámetros de desempeño, todos por encima del 97%, mostrando una eficacia de un 98.9%, similares al del método existente en la actualidad (16), evidencian su utilidad para el diagnóstico en el sistema de producción de material certificado de cítricos en Cuba.

Las evaluaciones realizadas forman parte de la primera fase de la metodología de validación de un ensayo o estrategia de diagnóstico, mediante la cual se establecen los parámetros y características de este (10). Para cumplimentar su evaluación a nivel poblacional, como proceso continuo de validación de ensayos, sería conveniente el análisis de un número mayor de controles y muestras que permitan confirmar la idoneidad de su uso en el programa de manejo y control de los viroides de los cítricos y realizar los ajustes que fueran necesarios. El empleo de la metodología que se propone para la detección del HSVd en muestras de cítricos disminuye el tiempo de toma de decisiones y el período de riesgo, aspectos de gran relevancia para los servicios especializados que garantizan la calidad fitosanitaria del material de propagación.

REFERENCIAS

1. Bernad, L. y Duran-Vila, N. (2006): A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Mol Cell Probes*. 20(2):105-113.
2. Farradá, F. (1998): *Paquete estadístico*. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), La Habana, Cuba.
3. Cohen, O.; Batuman, O.; Stanbekova, G.; Sano, T.; Mawassi, M. y Bar-Joseph, M. (2006): Construction of a multiprobe for the simultaneous detection of viroids infecting citrus trees. *Virus Genes*. 33(3): 287-292.
4. Daros, J.A.; Elena, S.F. y Flores, R. (2006): Viroids: an Ariadne's thread into the RNA labyrinth. *EMBO Rep*. 7(6):593-598.
5. Ding, B. e Itaya, A. (2007): Viroid: a useful model for studying the basic principles of infection and RNA biology. *Mol Plant Microbe Interact*. 20(1): 7-20.
6. Ding, B.; Itaya, A. y Zhong, X. (2005): Viroid trafficking: a small RNA makes a big move. *Curr Opin Plant Biol*. 8(6): 606-612.
7. Flores, R.; Delgado, S.; Gas, M.E.; Carbonel, A.; Molina, D.; Gago, S. y De la Peña, M. (2004): Viroids:

- the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters*, 567, 42-48.
8. Flores, R.; Hernández, C.; Martínez de Alba, A.E.; Darós, J.A. y Di Serio, F. (2005): Viroids and viroid host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 117-139.
 9. Ito, T.; Ieki, H. y Ozaki, K. (2001): Characterization of a new citrus viroid species tentatively named citrus viroid OS. *Arch Virol.* 146(5): 975-82.
 10. Jacobson, R.H. (1998). Validación de pruebas sexológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.* 17(2): 507-526.
 11. Palacio-Bielsa, A., Foissac, X. y Duran-Vila, N. (1999): Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 897-903.
 12. Palacio-Bielsa, A.; Romero-Durban, J. y Duran-Vila, N. (2004): Characterization of citrus HSVd isolates. *Arch. Virol.* 149(3): 537-552.
 13. Pelchat, M.; Rocheleau, L.; Perreault, J. y Perreault, J.P. (2003): SubViral RNA: a database of the smallest known auto-replicable RNA species. *Nucleic Acids Res.* 31(1): 444-5.
 14. Peña, I.; Pérez, J.M.; Batista, L.; Velázquez, K. y Alonso, M. (2004): Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. En *Curso taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos*. Ed. Fondo fiduciario Pérez Guerrero, Cuba, 119 pp.
 15. Peralta, Esther Lilia y Villoch, Alejandra (1999): Metodología para la validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados en el diagnóstico de fitopatógenos. En *X Congreso Latinoamericano de Fitopatógenos*. Guadalajara, México, Abstract No. 153.
 16. Pérez, R. (2004): Optimización del diagnóstico biológico del viroide de la cachexia de los cítricos. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*, Ministerio de la Agricultura, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), 109 pp.
 17. Pérez, R. (2004): Enfermedades ocasionadas por viroides en la citricultura. En *Curso taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos*. Ed. Fondo fiduciario Pérez Guerrero, Cuba, 119 pp.
 18. Pérez, R.; González, A.; Bello, L. y Marrero, A. (1992): Clemelín 11-20: a new indicador plant for citrus cachexia. En *Proc. 7th Intern. Citrus Cong.* 2: 786-787, Acireale, Italia, marzo 8-13.
 19. Qi, Y.; Pellisier, T.; Itaya, A.; Hunt, E.; Wassenegger, M. y Ding, B. (2004): Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell.* 16(7): 1741-1752.
 20. Querci, M.; Owens, R.A.; Vargsa, C. y Zalazar, L.F. (1995): Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Dis.* 79: 196-202.
 21. Rocha-Peña, M.; Lee, R.F.; Lastra, R.; Iblett, C.L.; Ochoa-Corona, F.; Garnsey, S.M. y Yokomi, R. (1995): Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Central and North America. *Plant Disease.* 79(5): 437-445.
 22. Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2da Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. U.S.A.
 23. Sanjuan, R.; Forment, J. y Elena, S.F. (2006): In silico predicted robustness of viroid RNA secondary structures. II. Interaction between mutation pairs. *Mol. Biol. Evol.* 23(11): 2123-2130.
 24. Velázquez, K. (2004): Caracterización biológica y molecular de viroides de cítricos de Cuba. Perfeccionamiento de su diagnóstico. *Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas*, Ministerio de la Agricultura, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT), 114 pp.
 25. Velázquez, K.; Soto, Marianela.; Pérez, R.; Pérez, J.M.; Rodríguez, D. y Duran-Vila, N. (2002): Biological and molecular characterization of two isolates of citrus viroids recovered from Cuban plantations. En *XV IOCV Conference*, Paphos, Chipre, noviembre 11-19, pag 258-263.

(Recibido 11-11-2005; Aceptado 26-3-2007)