

Seminario de Investigación “Hacia la implementación de un programa de certificación de cítricos para Colombia”

Viernes 19 de junio de 2009

Determinación y diagnóstico molecular del Viroide Exocortis (CEVd) y del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV)

Jorge Evelio Angel Díaz¹, Walter Turizo Alvarez¹, Lee Alexander Calvert², Iván Lozano Potes²

Desde que en 1930 se describió un síntoma en cítricos consistente en un rápido declinamiento y al cual se le denominó tristeza y que posteriormente en 1946 se asoció este síndrome a un virus denominado “Virus de la Tristeza de los Cítricos” (CTV), esta enfermedad de origen viral ha sido considerada la más importante en el cultivo de los cítricos, lo que quedó demostrado, desde que esta enfermedad ha causado la muerte de más de 100 millones de árboles en el mundo. El virus afecta los vasos conductores y células acompañantes de la planta produciendo un síntoma de declinamiento y muerte de la misma.

Otra enfermedad de los cítricos que limita su producción es causada por el viroide denominado de la Exocortis de los Cítricos (CEVd). Las pérdidas económicas producidas a causa de esta enfermedad se deben principalmente a la baja producción que se obtiene de los árboles infectados, alcanzando pérdidas hasta un 60%.

El objetivo de este trabajo fue implementar una metodología de diagnóstico molecular vericatoria para el Virus de la Tristeza de los Cítricos y el Viroide Exocortis a partir de aislamientos colombianos, como medida preventiva encaminada hacia el desarrollo de un programa de certificación de cítricos libre de estos patógenos para el país.

Para la detección del Viroide Exocortis, plantas de cítricos que mostraron síntomas de la enfermedad fueron seleccionadas y sus hojas colectadas para posteriormente realizar una extracción de RNA total y una prueba de transcripción reversa y PCR (RT-PCR), utilizando iniciadores específicos (CEVd-F1 y CEVd-R1) para amplificar una secuencia de aproximadamente de 371 pb. Esta secuencia se introdujo en un vector diseñado para clonar secuencias amplificadas por PCR (vector pCRII-TOPO 4.0 kb), dicho vector conteniendo la secuencia se utilizó para transformar *Escherichia coli*. La secuencia clonada se analizó por análisis de restricción y por secuenciación de la misma, evidenciándose la presencia del Viroide Exocortis mediante análisis de identidad de la secuencia correspondiente al 100% con la accesión AB054595.1 (análisis con el Programa Basic Blast - NCBI). Esta secuencia se utilizó para producir sondas marcadas con digoxigenina para realizar pruebas de hibridización de ácidos nucleicos (Dot-Blot hybridization) frente a muestras provenientes del Eje Cafetero, Valle del Cauca y un clon positivo de la Universidad de Florida (USA). El resultado de esta hibridización mostró alta sensibilidad y especificidad para detectar el viroide en plantas de cítricos.

Para la detección del Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV), se estandarizó la prueba de RT-PCR descrita por Bransky, *et al.* en 1977, utilizando iniciadores específicos (AFd y AFu) que hibridizan en una región correspondiente a la secuencia del gen de la cubierta proteica de CTV y producen un amplicón de 670 pb utilizando muestras de diferentes procedencias de zonas productoras de cítricos del país.

Como resultado de este trabajo se cuenta con una metodología altamente sensible y específica para la detección del Viroide Exocortis en plantas de cítricos para realizar análisis diagnósticos en serie y una prueba vericatoria de diagnóstico molecular para CTV. Estas pruebas diagnósticas pueden ser usadas como parte de un programa de certificación de cítricos para Colombia.

¹Laboratorio Nacional de Diagnóstico Fitosanitario y Análisis Molecular – LANDFAM, ICA – Tibaitatá, Mosquera (Cundinamarca), jorge.angel@ica.gov.co

²Centro Internacional de Agricultura Tropical – CIAT, Valle (Colombia), i.lozano@cgiar.org