



**Centro Internacional de Agricultura Tropical**  
**International Center for Tropical Agriculture**  
*Consultative Group on International Agricultural Research*



### **Proyecto:**

Desarrollo e Implementación de una Red Nacional para Certificación Fitosanitaria de Cítricos Competente a Nivel Mundial.

### **Informe realizado por el Laboratorio de Virología-CIAT**

**Investigadores: Iván Lozano P., Manuel G. Moreno P. y Lee A. Calvert**

Son muchas las enfermedades que afectan los cítricos en todo el mundo y se les ha agrupado dependiendo del agente causal. Las enfermedades por virus son cada vez más numerosas y se han constituido en el peligro más grave que afronta la industria cítrica, ya que no existe ninguna forma de control químico como en el caso de enfermedades causadas por otros agentes. La ocurrencia y severidad de ciertas enfermedades está determinada por la virulencia del patógeno, la susceptibilidad del huésped y las condiciones ambientales. Colombia cuenta con las condiciones adecuadas para comenzar con el plan de certificación de material en viveros y con las técnicas de diagnóstico para algunas de las enfermedades virales más importantes.

La enfermedad de la leprosis de los cítricos es causada por el virus de la leprosis de cítricos (CiLV) y es transmitida por los ácaros del género *Brevipalpus* spp. La enfermedad se disemina rápidamente en huertos no tratados, reduciendo la producción, debilitando y causando la muerte

de árboles infectados. Actualmente se encuentra en Colombia y representa un gran riesgo.

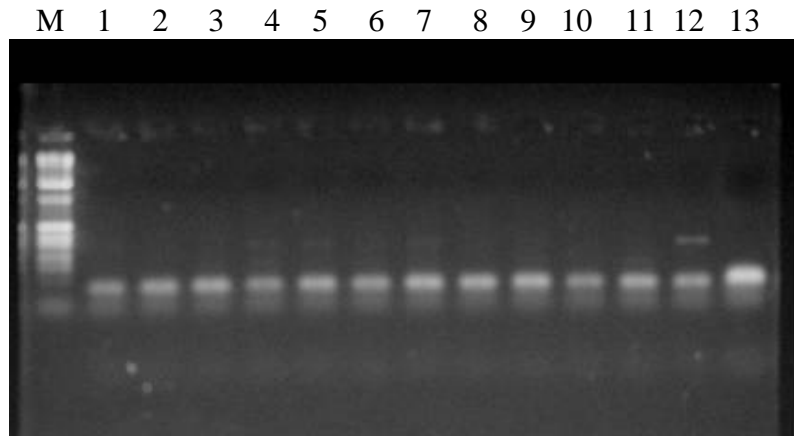
El virus de la Psorosis de los cítricos (CPsV) es una enfermedad sistémica caracterizada por el agrietamiento y desprendimiento de la corteza y se transmite por injerto.

Entre los viroides se destaca Exocortis (CEVd), que se caracteriza por producir una descamación de la corteza y grietas sobre el patrón; la copa desarrolla diferentes grados de enanismo.

## **METODOLOGÍA PARA DIAGNÓSTICO DE LEPROSIS (CiLV), PSOROSIS (CPsV) Y EXOCORTIS (CEVd) POR RT-PCR E HIBRIDACIÓN NO RADIATIVA.**

### **RT-PCR para diagnóstico de la enfermedad de la Psorosis.**

Se procesaron muestras de tejido foliar con síntomas aparentes de psorosis ocasionada por citrus psorosis virus (CPsV) procedentes del departamento del Quindío. El ARN total de estas muestras fue extraído usando el Kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI, USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Para cada muestra la síntesis de ADN complementario se realizó usando 10µl de ARN total, 1,5µl 10µM del cebador (primer) antisentido: 5' AAG TTT CTA TCA TTC TGA AAC CC 3' ( *J of Virol Meth* 129 (2005) 47-55). Se incubó durante 8 minutos a 65°C. seguido de un enfriamiento en hielo. Se adicionó una mezcla que contenía 5x 1st strand búfer, 0,1 M DTT, 10 mM dNTPs y 40 unidades de la enzima Superscript II Rnase H-Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad CA) y 20 unidades de RnaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). Se incubó cada reacción por una hora a 37°C, la reacción fue suspendida por incubación 10 minutos a 70°C. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se tomaron 2 µl de cada ADNc en un volumen final de 25µl que contenía 5x buffer Taq polymerase, 1 unidad de Taq DNA polymerase (Promega), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs y 10µM de cada primer en antisentido y sentido: 5' ACA AAG AAA TTC TCC ACT TTT ACG T 3' ( *J of Virol Meth* 129 (2005) 47-55 ). La PCR se llevó de acuerdo al siguiente perfil: 94°C 2 min, 47°C 1,5 min, 72°C 1,5 min, seguido de 34 ciclos de 94°C 1min, 47°C 1min, 72°C 1 min. y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Los productos fueron analizados en gel de agarosa al 1,5 % que contenía 25x *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen) (Figura1).

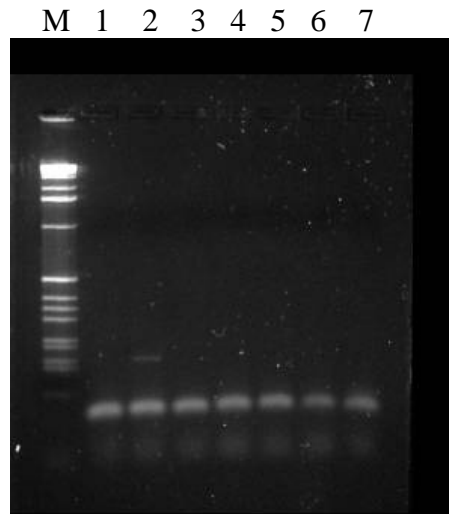


**Figura1.** Gel de agarosa al 1.5 %. M: Marcador de peso molecular 1 Kb. 1-13: Productos de PCR de diferentes muestras analizadas.

### Diagnóstico de Psoriasis por RT-PCR Semi-anidado.

Se utilizaron los primers de la secuencia del ARN1 de CPsV. Primer #1: 5'ACA ATA AGC AAG ACA AC 3'. Primer #6: 5'GAG GAA GGT ATT TCC ATA GG 3' y Primer #7: 5' CCT ATT AAT GAT AAT TGC AC 3' ( *J of Virol Meth* 84 ( 2000) 15-22 ).

10 µl de ARN total fueron incubados por 8 minutos a 70°C con los primers #1 y #7 en una concentración de 10µM. La reacción se enfrió en hielo y enseguida se adicionó una mezcla de 5x 1st strand búfer, 0,1 M DTT, 10 mM dNTPs y 40 unidades de la enzima Superscript II Rnase H-Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad CA) y 20 unidades de RnaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). Se incubó cada reacción por una hora a 37°C, la reacción fue suspendida por incubación de 10 minutos a 70°C. Para la reacción de PCR se tomó 1µl de ADNc en un volumen final de 25µl que contenía 5x buffer Taq polymerase, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dNTPs, 10 µM de cada primer #1 y #7, 1 unidad de Taq DNA polymerase. El PCR se condujo de acuerdo a un perfil de 94°C por 2 minutos y 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 46°C 1 minuto, 72°C 1 minuto y una extensión final a 72°C por 10 minutos. El PCR semi-anidado se realizó tomando un microlitro del primer PCR y usando los primers #6 y #7 en las mismas condiciones de reacción del primer PCR con un grado más de apareamiento (47°C) para los primers. Los productos fueron visualizados en gel de agarosa al 2% que contenía 25x SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) (Figura2).

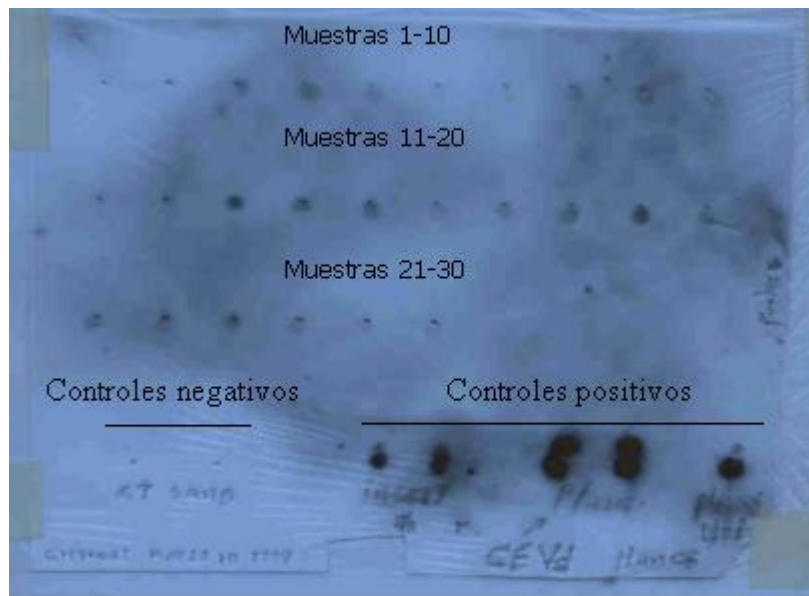


**Figura 2.** Gel de agarosa al 1.5 %. M: Marcador de peso molecular 1 Kb. 1-7: Productos de RT-PCR anidado de las diferentes muestras analizadas.

### **Hibridación de ácidos nucleicos para la detección no radiactiva del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd).**

Se realizaron hibridaciones en 'dot blot' de ARN total de muestras recolectadas en los departamentos de Risaralda, Quindío y Valle del Cauca. De cada muestra se homogenizaron 100 mg de tejido en nitrógeno líquido. El ARN total de estas muestras fue extraído usando el Kit : *SV Total RNA Isolation System* (Promega, Madison, WI USA) de acuerdo a instrucciones del fabricante. Se utilizaron controles sanos y como controles positivos el clón de exocortis obtenido en el laboratorio de diagnóstico fitosanitario y análisis molecular del ICA, seccional Cundinamarca-Mosquera y un clon de exocortis de un aislamiento de Florida-USA (Figura 3).

Se utilizó como sondas ADN del clon de exocortis del aislamiento colombiano y de Florida (USA) en experimentos separados. Se utilizó marcaje no radiactivo con la metodología Dig high prime DNA labeling and detection starter Kit II (Roche, Mannheim, Germany).



**Figura 3.** Resultados obtenidos mediante la hibridación de ácidos nucleicos de muestras recolectadas en el eje cafetero.

### **Detección del virus de la leprosis tipo citoplasmático (CiLV-C)**

(M.G. Moreno M.)

El material analizado provino de plantas de cítricos de los departamentos de Meta (Corpoica) y Casanare (ICA) con síntomas típicos de leprosis. Los controles positivos y negativos fueron proporcionados por el Centro APTA Citros Sylvio Moreira de Brasil.

**Extracción de ARN de doble cadena (dsARN) para RT-PCR:** se realizaron mini extracciones de dsARN con las modificaciones del método de Morris y Dodds, por el laboratorio de Virología de CIAT. Se partió de 100mg de tejido vegetal infectado y se pulverizó con nitrógeno líquido, se adicionó 2 volúmenes/gr de búfer de extracción (2X STE, SDS al 2%, Bentonita 0,1%, 2-Mercaptoetanol 0,5%), 2 volúmenes de fenol saturado con búfer STE 1X, 0,5 volumen de Cloroformo –alcohol Isoamílico (24:1), seguido de vortex por un minuto. Centrifugación a 10.000 rpm a 4°C 10 minutos. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos y se ajustó la concentración de etanol al 16,5%. Se adicionó 0,1gr de celulosa CF-11 por gramo de tejido en una columna cromatográfica y 2 volúmenes de STE 1X al 16,5% de etanol; esta mezcla se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C por 3 minutos, se descartó el sobrenadante (este paso se repitió 3 veces).

Luego se adicionó 200 microlitros de búfer STE 1X , se centrifugó a 10.000rpm a 4°C 3 minutos y se tomó el sobrenadante en tubo nuevo (este paso se repitió 3 veces). En seguida se adicionó 1 ml de etanol absoluto, se incubó a -20°C por dos horas. Finalmente se centrifugó a 10.000rpm 5 min a 4°C. El pellet se secó al vacio y se resuspendió en 25 microlitros ( $\mu$ l) de agua libre de RNAasas.

**Síntesis del ADN complementario (ADNc):** el ADNc se sintetizó a partir de una mezcla de 3 $\mu$ l de dsARN (aprox. 100ng), 1 $\mu$ l de dNTPs (10 mM), 1 $\mu$ l de Random Primers, 7 $\mu$ l de agua. Se incubó a 65°C por 5 minutos y se enfrió en hielo. En seguida se adicionó 2 $\mu$ l de búfer RT(10X), 4 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2 $\mu$ l DTT (0,1M), 1 $\mu$ l de RNase OUT; se incubó a 37°C 2 min, en seguida se adicionó 1 $\mu$ l de Transcriptasa Reversa (50 Units) y se continuó la incubación a 25°C 10 minutos, 37°C 50 minutos y 70°C 15 minutos, se adicionó 1 $\mu$ l de RNase-H y se incubó por 20 minutos a 37°C.

**PCR:** Los cebadores o primers utilizados fueron específicos para amplificar una región de 339 pares de bases (bp) del gen que codifica para la proteína de movimiento del CIAV-C:

MP-F 5'GCG TAT TGG CGT TGG ATT TCT GAC 3' y MP-R 5'TGT ATA CCA AGC CGC CTG TGA ACT 3' (Plant Dis 87 (2003), 1317-1321).

La reacción de PCR se realizó de acuerdo a la siguiente mezcla: 2,5 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,5 $\mu$ l de búfer 10X, 0,5 $\mu$ l de dNTPs (10mM), 0.3  $\mu$ l de primer MP-R (10  $\mu$ M). 0.3  $\mu$ l de primers MP-F (10  $\mu$ M), 0.20  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (1,0U) y 2  $\mu$ l de ADNc en un volumen final de 25  $\mu$ l de agua estéril. Las condiciones de amplificación fueron: (1)94°C 5 min., (2) 94°C 30 segundos, (3)60°C 30 segundos, (4)72°C 40 segundos, se repitió 32 veces desde el paso número (2) y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos se analizaron en gel de agarosa al 1,5%(dato no mostrado).

## **RESULTADOS**

Dado que no se obtuvo un producto de amplificación del tamaño esperado, los resultados para las pruebas de PCR y PCR-semianidado para CPsV, permiten concluir que es posible que los cebadores utilizados para amplificar el virus causante de la enfermedad no son compatibles con la cepa colombiana y se hace necesario insistir en obtener un clón de la cepa colombiana mediante la técnica de dsARN y posterior síntesis aleatoria del ADNc.

La prueba de hibridación no radiactiva para el análisis masivo de muestras para CEVd, es perfectamente aplicable al diagnóstico de esta enfermedad.

Para CiLV se obtuvo con esta metodología un producto de amplificación del tamaño esperado, Los resultados de la secuenciación de este fragmento de ADN fueron compatibles en el Banco de genes mundial (GenBank) con el virus de la leprosis (Figura 4). Este amplificado servirá en un futuro como control positivo en las pruebas de detección de CiLV y en la estandarización de la metodología de diagnóstico para este patógeno viral.

<a href="#">gb ABG33782.1</a>	31 kDa protein [Cytoplasmic citrus leprosis vi...	<a href="#">178</a>	2e-43
<a href="#">gb ABA42871.1</a>	p32 [Cytoplasmic citrus leprosis virus]	<a href="#">178</a>	2e-43
<a href="#">ref YP_654542.1</a>	putative movement protein [Cytoplasmic citru...	<a href="#">178</a>	2e-43 <b>G</b>
<a href="#">gb ACL99771.1</a>	movement protein [Citrus leprosis virus C]	<a href="#">168</a>	1e-40
<a href="#">emb CAD30668.1</a>	N-methyl D-aspartate receptor 2B [Mus musculus]	<a href="#">36.6</a>	0.86 <b>G</b>
<a href="#">gb AAC04352.1</a>	nonstructural 1 protein [Dengue virus type 3]	<a href="#">36.2</a>	1.1
<a href="#">gb AAB52245.1</a>	nonstructural protein 1 [Dengue virus type 3]	<a href="#">36.2</a>	1.1
<a href="#">gb AAB52244.1</a>	nonstructural protein 1 [Dengue virus type 3]	<a href="#">36.2</a>	1.1
<a href="#">gb AAC50324.1</a>	protein tyrosine phosphatase epsilon cytoplasm...	<a href="#">36.2</a>	1.1 <b>G</b>
<a href="#">gb AAB52252.1</a>	nonstructural protein 1 [Dengue virus type 3]	<a href="#">36.2</a>	1.1
<a href="#">gb AAB52251.1</a>	nonstructural protein 1 [Dengue virus type 3]	<a href="#">36.2</a>	1.1
<a href="#">dbj BAF34626.1</a>	dissimilatory sulfite reductase beta subunit ...	<a href="#">35.8</a>	1.5
<a href="#">gb AAK38765.1</a>	methyltransferase CmuC [Aminobacter sp. IMB-1]	<a href="#">34.7</a>	3.3
<a href="#">emb CAD24436.1</a>	photosystem II protein D1 [Palmaria decipiens]	<a href="#">34.7</a>	3.3
<a href="#">gb AAM27880.1 AF498420_14</a>	ORF_14; similar to NAD dependent ep...	<a href="#">34.3</a>	4.3
<a href="#">ref ZP_04935161.1</a>	NAD dependent epimerase/dehydratase-like p...	<a href="#">33.1</a>	9.5
<a href="#">gb AAM27548.1 AF498400_14</a>	ORF_14; similar to NAD dependent ep...	<a href="#">33.1</a>	9.5
<a href="#">gb AAO17397.1</a>	NAD dependent epimerase/dehydratase-like prote...	<a href="#">33.1</a>	9.5

>  [gb|ABG33782.1](#) 31 kDa protein [Cytoplasmic citrus leprosis virus]

Length=279

Score = 178 bits (451), Expect = 2e-43

Identities = 91/99 (91%), Positives = 93/99 (93%), Gaps = 0/99 (0%)

Frame = +1

Query 4 GFINRKAEDAGVRSVEXFRQISDVVLIIVPXIALPAELSLKLVDSANILEAVNDQXVTVN 183  
 GFINRKAEDAGVRSVE FRQISDVVLIIVP IALPAELSLKLVDSANILEAVNDQ VTVN

Sbjct 64 GFINRKAEDAGVRSVESFRQISDVVLIIVPQIALPAELSLKLVDSANILEAVNDQEVTVN 123

Query 184 ITGGPCVVMNCAHSIPNEDRTHVNGSEVHRRLV IQS RI 300  
 TGGPCVVMNCAHSIPNEDRTHVNGSEVHRRL IQ ++

Sbjct 124 STGGPCVVMNCAHSIPNEDRTHVNGSEVHRRLGIQYQV 162

**Figura 4.** Comparación de la secuencia del clon de CiLV obtenida con el GenBank