

Detección por RT-PCR Punto Final y Tiempo Real de Tres Especies de Viroides en Cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México

Detection of Three Citrus Viroids Species From Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico by Conventional and Real Time RT-PCR

César Enrique Guerrero Gámez, Omar Guadalupe Alvarado Gómez*, Hazael Gutiérrez Mauleón, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad s/n Ciudad Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. CP 66451, México; **Ramiro González Garza,** Biociencia S.A. Agustín Melgar 2317 norte Col. Reforma, Monterrey, N.L., CP 64550, México; **María Genoveva Álvarez Ojeda,** INIFAP, Campo Experimental Río Bravo, Tamaulipas. **Mauricio Luna Rodríguez.** Dirección General de Investigaciones, Universidad Veracruzana. *Correspondencia: omar-alvarado@prodigy.net.mx.

(Recibido: Enero 24, 2013 Aceptado: Marzo 13, 2013)

Guerrero Gámez CE, Alvarado Gómez OG, Gutiérrez Mauleón H, González Garza R, Álvarez Ojeda MG y Luna Rodríguez M. 2013. Detección por RT-PCR punto final y tiempo real de tres especies de viroides en cítricos de Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 30:20-28.

Resumen. Se desarrollaron tres protocolos de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green y se compararon con el método convencional RT-PCR punto final para la detección del viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd), el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) y el viroide del enanismo de los cítricos (CDVd) tras evaluar distintas combinaciones de iniciadores específicos; adicionalmente se realizó el análisis para los tres viroides referidos en 90 muestras de cítricos colectadas en huertas del noreste de México. Las muestras evaluadas comprendieron diferentes especies colectadas en los municipios de General Terán, Montemorelos y Marín, en Nuevo León, además de Río Bravo, Cd. Victoria e Hidalgo, en Tamaulipas. Se extrajo el ARN total de las muestras, y fueron analizadas mediante las técnicas de RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. Se detectó la presencia individual y conjunta de los viroides CEVd, HSVd y CDVd en las muestras analizadas. Usando la técnica de RT-PCR tiempo real con SYBR Green, se obtuvo un 41 % de muestras positivas a CEVd, 42 % a HSVd y 49 % al CDVd. Al comparar las técnicas de RT-PCR punto final y tiempo real, se obtuvieron resultados similares.

Palabras clave adicionales: RT-PCR, RT-PCR tiempo real, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

Abstract. Three protocols were developed based on real-time RT-PCR with SYBR Green system and were compared with conventional RT-PCR for detection of the Citrus exocortis viroid (CEVd), Hop stunt viroid (HSVd) and Citrus dwarf viroid (CDVd) using specific primers combinations; additionally, we conducted the analysis of citrus viroids from 90 citrus threes samples collected in orchards in the northeast of Mexico. Evaluated citrus samples comprised different species from the municipalities of General Terán, Montemorelos and Marín, Nuevo León, besides Río Bravo, Victoria city and Hidalgo, Tamaulipas. Total RNA was extracted from the samples and analyzed by the techniques of multiple RT-PCR and real time RT-PCR with the SYBR Green system. We detected CEVd, HSVd and CDVd viroids individually and jointly in the samples. Using real-time RT-PCR with SYBR Green, we found a 41 % of CEVd positive samples, 42 % for HSVd and 49 % to CDVd. Comparing endpoint multiplex RT-PCR with real-time RT-PCR techniques, minimal differences were obtained in the results.

Additional keywords: RT-PCR, real-time RT-PCR, SYBR Green, CEVd, HSVd, CDVd.

Mexico is one of the major producers of Persian lime, Mexican lime, sweet orange, grape fruit, tangerine and other citrus species, and it is one of the main exporting countries world wide (USDA, 2012).

During 1972 and 1977, the causal agents of the diseases exocortis (CEVd) and citrus cachexia (HSVd) were identified (Diener, 1979). Later on, in 1988 the Citrus Dwarfing Viroid (CDVd) was identified (Duran-Vila *et al.*,

México se ha distinguido por su producción de limón persa, limón mexicano, naranja dulce, toronja, mandarina y otras especies de cítricos, y es de los principales países exportadores a nivel mundial (USDA, 2012).

En los años 1972 y 1977 se identificaron los agentes causales de las enfermedades exocortis (CEVd) y cachexia de los cítricos (HSVd), respectivamente (Diener, 1979). Posteriormente, en 1988 se identificó el viroide del enanismo de los cítricos, CDVd (Duran-Vila *et al.*, 1988). Los viroides de cítricos se encuentran distribuidos en distintas partes del mundo, tales como: la región del Mediterráneo, Australia, Norte y Sur de África, Europa, Asia, además del Norte, Centro y Sur del Continente Americano (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.*, 2003; Önelge, 2010).

Los viroides de los cítricos pertenecen a la familia *Pospiviroidae*. Están constituidos por moléculas de ARN monocatenario cerradas covalentemente sin capacidad codificante, y capaces de replicarse de forma autónoma utilizando la maquinaria transcripcional de las células que parasitan. El tamaño de su genoma es de alrededor de 246-402 nt; presentan forma de varilla o ramificada y ocasionan diferentes síntomas de acuerdo con las combinaciones entre especies de viroides y hospederos, pudiendo existir incluso sinergismo entre viroides, cuando ocurren de manera simultánea en más de una especie. Pueden provocar agrietamientos y escamas en la corteza, enanismo, epinastia, entre otros daños, en especies susceptibles (Flores, 2001; Vidalakis *et al.*, 2004; Bernard y Duran-Vila, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Bagherian y Izadpanah, 2010).

Habitualmente los viroides de los cítricos se diagnostican mediante bioensayos en la planta indicadora cidra Etrog Arizona 861-S1 (*Citrus medica* L.) injertada sobre limón rugoso (*C. jambhiri* Lush) y Volkameriano (*C. volkameriana* Ten y Pasq.) pudiendo observarse la expresión de los síntomas de 3 a 6 meses después de su inoculación (Palacio *et al.*, 1999). Sin embargo, estos síntomas no permiten identificar la especie del viroide. El análisis de ácidos nucleicos mediante técnicas moleculares constituyen una alternativa a los bioensayos para la detección e identificación de las especies de los viroides de los cítricos (Malfitano *et al.*, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Mohamed *et al.*, 2009). Algunos trabajos han demostrado el potencial de la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (RT-PCR) para la detección individual de viroides, y la RT-PCR múltiple para la detección simultánea de varios viroides (Ito *et al.*, 2002; Bernard y Duran-Vila, 2005; Wang *et al.*, 2009). En México hay pocos trabajos sobre la detección de viroides de cítricos por RT-PCR (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002 y 2005). En años recientes se han puesto a punto técnicas de detección de patógenos y moléculas mas sensibles y rápidas, como la RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green y sondas TaqMan, la cual intercala una molécula fluorescente en la doble cadena de ADN produciendo una señal que revela, con la ventaja de la amplificación exponencial en cada ciclo térmico. Gracias a su potencial la RT-PCR en tiempo real se ha utilizado para la detección del viroide del tubérculo fusiforme de la papa,

1988). Citrus viroids are distributed in different parts of the world such as the Mediterranean region, Australia, North and South Africa, Europe, Asia, and North, Central and South Americas (Timmer *et al.*, 2000; Hadidi *et al.* 2003; Önelge, 2010).

Citrus viroids belong to the *Pospiviroidae* family. They consist of single-stranded RNA molecules covalently linked without coding capacity and that are able to replicate autonomously using the transcriptional machinery of the cells they parasitize. Their genome size is about 246-402 nt; they are rod-shaped or branched and can cause various symptoms depending on the combinations between viroid and host species, even synergism among viroids can exist when they occur simultaneously in more than one species. They can cause cracking and flaking of the bark, stunting, epinasty, among other damages in susceptible species (Flores, 2001; Vidalakis *et al.*, 2004, Bernard and Duran-Vila, 2005; Verniere *et al.*, 2006; Bagherian and Izadpanah 2010).

Usually citrus viroids are diagnosed using bioassays in the indicator plant Arizona 861-S1 Etrog citron (*Citrus medica* L.) grafted on rough lemon (*C. jambhiri* Lush) and Volkamerian (*C. volkameriana* Ten and Pasq.) observing the symptoms expression 3-6 months after inoculation (Palace *et al.*, 1999). However, these symptoms do not allow to identify the viroid species. Nucleic acid analysis using molecular techniques provide an alternative to bioassays for detection and identification of citrus viroids species (Malfitano *et al.*, 2005; Verniere *et al.*, 2006 Mohamed *et al.*, 2009). Some studies have shown the potential of the reverse transcription followed by conventional polymerase chain reaction (RT-PCR) to detect individual viroids, and multiple RT-PCR for simultaneous detection of several viroids (Ito *et al.*, 2002, Bernard and Duran-Vila, 2005, Wang *et al.*, 2009). In Mexico there are few studies on the detection of citrus viroids by RT-PCR (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002 and 2005). In recent years, techniques for pathogen detection and faster and more sensitive molecules have been tuned, such as real time RT-PCR using SYBR Green system and TaqMan probes, which they insert a fluorescent molecule in the double-stranded DNA chain producing a signal that reveals the advantage of the exponential amplification on each heat cycle. Due to real time RT-PCR potential, it has been used to detect the potato spindle tuber viroid, as well as citrus viroids such as CEVd, HSVd and CDVd (Tessitori *et al.*, 2005; Rizza *et al.* 2009).

Because of the problems that viroids cause in citrus, in addition to the scarce information of their incidence in Mexico, studies on citrus plantations in the northeastern region are necessary in order to have a more accurate perception of the current phytosanitary situation. Therefore, the aim of this work was to implement the real time RT-PCR method with SYBR Green system and compare it with the endpoint RT-PCR method to determine the incidence of three citrus viroids in commercial plantations of the Nuevo Leon and Tamaulipas states, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Real-time RT-PCR standardization. Real-time

además de viroides de cítricos como el CEVd, HSVd y CDVd (Tessitori *et al.*, 2005; Rizza *et al.*, 2009).

Debido a los problemas que causan los viroides en los cítricos, además de la escasa información que existe sobre su incidencia en México, es necesario realizar estudios en plantaciones cítricas en la región noreste para tener una percepción más precisa de la situación fitosanitaria actual. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue implementar el método de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green y compararlo con el método de RT-PCR punto final al determinar la incidencia de tres viroides de los cítricos en plantaciones comerciales de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estandarización de RT-PCR tiempo real. Se estandarizó la técnica de RT-PCR tiempo real en un solo paso con el sistema iScript™ One-Step RT-PCR con SYBR Green® (Bio-Rad), utilizando controles positivos de ARN total conteniendo a los viroides CEVd, HSVd y CDVd; los cuales fueron proporcionados por la empresa Biociencia S.A. Como controles negativos se utilizó ARN de plantas libres de viroides. Se evaluaron varias combinaciones de iniciadores específicos a cada uno de los viroides anteriores (Cuadro 1). Para cada uno de los ensayos se utilizó un

RT-PCR technique was standardized in one step with the iScript™ One-Step RT-PCR system with SYBR Green® (Bio-Rad), using total RNA positive controls containing CEVd, HSVd and CDVd viroids, which were provided by Biociencia SA Company. RNA viroid-free plants were used as negative controls. Various combinations of specific primers were evaluated on each of the previous viroids (Table 1). For each assay a thermal program according to manufacturer's specifications was used and the annealing temperature for CEVd was 56 °C and 58 °C for HSVd and CDVd. Furthermore, in order to make sure that primers did not form dimers, an 80 cycle's dissociation curve at 55-95 °C for 1 min was integrated on each assay with 0.5 °C increments per cycle.

Analysis of field samples. A lot of 90 collected samples was processed in eight commercial citrus orchards located in the municipalities of General Teran (Las Anacuas and Jorge Martinez), Montemorelos (Hacienda "El Mexiquito") and Marin (Experimental Field of the Agronomy Faculty, UANL), Nuevo Leon state; furthermore, some samples were obtained from INIFAP Experimental field and from "Real de Catorce" commercial orchard located in the municipalities of Rio Bravo and Ciudad Victoria, respectively; also from the orchards "El Desengaño" and "Puente Azul" (Hidalgo, Tamaulipas).

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para las reacciones de RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green para tres viroides de cítricos.

Table 1. Primers used for real-time RT-PCR with SYBR Green system for three citrus viroids.

Tratamiento	Iniciador	Secuencia 5'-3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
1	CEVd-5 CEVd-F	acgagctcctgttttcccgcgtg ggaaacctggaggaagtcg	165	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Palacio <i>et al.</i> (1999)
2	CEVd-F CEVd-b	ggaaacctggaggaagtcg tgtttctccgctggagcgcg	83	Palacio <i>et al.</i> (1999) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
3	CEVd-7 CEVd-b	ccgggcgagggtgaaagccc tgtttctccgctggagcgcg	169	Sieburth <i>et al.</i> (2002) Tessitori <i>et al.</i> (2005)
4	CEVd-5 CEVd-7	acgagctcctgttttcccgcgtg ccgggcgagggtgaaagccc	86	Sieburth <i>et al.</i> (2002)
5	HSVd-b CVdII-H1	gtctcactcgaagagccag cgcccggggcaactcttctcagaatcc	138	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Palacio <i>et al.</i> (1999)
6	CCaVd-der CVdII-H1	cgcggcagaggtcagatag cgcccggggcaactcttctcagaatcc	202	Levy y Hadidi (1993) Palacio <i>et al.</i> (1999)
7	HSVd-b CV2-AP (+)	gtctcactcgaagagccag ggcaactcttctcagaatccagc	131	Tessitori <i>et al.</i> (2005) Ito <i>et al.</i> (2002)
8	CCavd-der CV2-AP (+)	cgcggcagaggtcagatag ggcaactcttctcagaatccagc	195	Levy y Hadidi (1993) Ito <i>et al.</i> (2002)
9	CVdIII-C CVdIII-F	ttcgtcgacgacgacaggta gtctccgctagtcggaaagactccg	85	Palacio <i>et al.</i> (1999) Sieburth <i>et al.</i> (2002)
10	CVdIII-F CVdIII-R	gtctccgctagtcggaaagactccg cgtcaccaacttagctgccttcgt	269	Sieburth <i>et al.</i> (2002)

programa térmico de acuerdo con las especificaciones del fabricante cambiando solamente la temperatura de anillamiento siendo de 56 °C para CEVd, y 58 °C para HSVd y CDVd. Además para comprobar que los iniciadores no formaran dímeros, a cada ensayo fue integrada una curva de disociación de 80 ciclos a una temperatura de 55-95 °C durante 1 min. con incrementos de 0.5 °C por cada ciclo.

Análisis de muestras de campo. Se procesaron 90 muestras colectadas en ocho huertas comerciales de cítricos, ubicadas en los municipios de Gral. Terán (Las Anacuas y Jorge Martínez), Montemorelos (Hacienda “El Mexiquito”) y Marín (Campo Experimental de la Facultad Agronomía de la UANL) del estado de Nuevo León; además se obtuvieron muestras del Campo Experimental del INIFAP y del huerto comercial “Real de Catorce” ubicados en los municipios de Río Bravo y Cd. Victoria, respectivamente; y de los predios “El Desengaño” y “Puente Azul”, en Hidalgo, Tamaulipas. Las especies de cítricos muestreadas fueron: naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.), toronja (*C. paradisi* M.), limón (*C. limon* L.) y mandarina (*C. reticulata* B.). Se colectaron de manera aleatoria ramas y hojas de árboles adultos. Se realizó una extracción del ácido ribonucleico total (ARN) de las muestras mediante el método comercial Trizol[®] (Molecular Research Center), y se analizaron las muestras por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real en un solo paso. Los iniciadores utilizados en las reacciones de RT-PCR punto final se describen en el Cuadro 2.

Las reacciones de RT-PCR múltiple punto final fueron llevadas a cabo en un volumen 25 µL de acuerdo con Wang *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. Se utilizó el kit Super Script One step RT-PCR system Taq DNA Polimerasa Platinum[®] (Invitrogen). En las mezclas de reacción se incorporaron los iniciadores a una concentración de 0.2 µM para CDVd, 0.5 µM para CEVd y 0.1 µM para HSVd (Cuadro 2). El protocolo consistió en mezclar 12.5 µL de amortiguador 2X, 6.75 µL de una mezcla de 6 iniciadores, 0.5 µL de enzima RT-*Taq* y de 150 a 200 ng de ARN (2 µL). Se completó el volumen total con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros térmicos de las reacciones, comienzan con una incubación a 50 °C durante 30 min para la síntesis de ADNc, seguido por una desnaturalización inicial a 94 °C por 2 min y 35 ciclos con un paso de

The citrus species sampled were: sweet orange (*Citrus sinensis* L.), grape fruit (*C. paradisi* M.), lemon (*C. limon* L.) and mandarin (*C. reticulata* B.). Samples were collected from random branches and leaves of mature trees. Total ribonucleic acid (RNA) of the samples was extracted by the Trizol[®] (Molecular Research Center) commercial method and they were analyzed by multiple endpoint RT-PCR and real-time RT-PCR in one step. The primers used in the RT-PCR endpoint reactions are described in Table 2.

The multiple endpoint RT-PCR reactions were carried out in a volume of 25 µL according to Wang *et al.* (2009) with slight modifications. Super Script One step RT-PCR system Taq DNA Polymerase Platinum[®] (Invitrogen) kit was used. In the reaction mixtures, the primers were added at a concentration of 0.2 µM for CDVd, 0.5 µM for CEVd and 0.1 µM for HSVd (Table 2). The protocol consisted of mixing 12.5 µL of buffer 2X, 6.75 µL of a mixture of 6 primers, 0.5 µL of RT-*Taq* enzyme and 150 to 200 ng of ARN (2 µL). The total volume was completed with sterile water free of nucleases. Thermal parameters of the reactions started with a 50 °C incubation for 30 min for the cDNA synthesis, followed by an initial denaturation at 94 °C for 2 min and 35 cycles with a denaturation step at 94 °C for 30 s, an annealing at 58 °C for 30 s, and extension at 68 °C for 45 s, and a final extension at 68 °C for 7 min. The products of the multiple RT-PCR were analyzed in 1.5 % agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL⁻¹) and visualized on a UV light transilluminator.

The same samples were processed by real time RT-PCR using SYBR Green system with primers specific to CEVd, HSVd and CDVd viroids selected in the previous step. The reactions were carried out in a mixture of 25 µL with the iScript[™] One Step RT-PCR SYBR Green[®] kit (Bio-Rad). The reaction was carried out with a 0.3 mM concentration of the primers. The SYBR Green protocol consisted of 12.5 µL of buffer 2X, 0.75 µL of each primer, 0.5 µL of the iScript RT enzyme, 2 µL of RNA, and total volume was completed with 25 µL of nuclease-free sterile water. Temperature parameters for HSVd and CDVd were the following: 50 °C for 10 min, 95 °C for 5 min, 35 cycles with a denaturation step of 95 °C for 10 s, annealing at 58 °C for 30 s. Temperature parameters for CEVd were the same as

Cuadro 2. Iniciadores utilizados para el RT-PCR múltiple en un solo paso para tres viroides de cítricos.
Table 2. Primers used for multiple RT-PCR in one step for three citrus viroids.

Iniciador	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del producto (pb)	Referencia
CEV-R	ccggggatccctgaagga	371	Gross <i>et al.</i> (1982)
CEV-F	ggaaacctggaggaagtcg		
HSVd-R	ccggggctcccttctcagtaagt	302	Sano <i>et al.</i> (1988)
HSVd-F	ggcaacttctcagaatccagc		
CVd-III-R	cgtcaccaacttagctgccttcgt	269	Sibeburth <i>et al.</i> (2002)
CVd-III-F	gtctccgctagtcggaaagactccg		

desnaturalización a 94 °C durante 30 s, un anillamiento a 58 °C por 30 s, y una extensión a 68 °C por 45 s, además de una extensión final a 68 °C durante 7 min. Los productos de la RT-PCR múltiple fueron analizados en geles de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio ($0.5 \mu\text{g/mL}^{-1}$) y visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta.

Las mismas muestras fueron procesadas mediante RT-PCR en tiempo real utilizando el sistema de SYBR Green con el uso de iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd, y CDVd, seleccionados en la etapa anterior. Las reacciones fueron realizadas en una mezcla de 25 μL con el kit iScript™ One Step RT-PCR SYBR Green® (Bio-Rad). La reacción fue formada con una concentración de iniciadores de 0.3 μM . El protocolo utilizado de SYBR Green consistió en 12.5 μL de amortiguador 2 X, 0.75 μL de cada uno de los iniciadores, 0.5 μL de enzima iScript RT, 2 μL de ARN y se completó el volumen total a 25 μL con agua estéril libre de nucleasas. Los parámetros de temperatura para HSVd y CDVd fueron los siguientes: 50 °C durante 10 min, 95 °C por 5 min, 35 ciclos con un paso de desnaturalización de 95 °C por 10 s, anillamiento de 58 °C durante 30 s. Los parámetros de temperatura para CEVd fueron iguales que el anterior con la diferencia que la temperatura de anillamiento fue de 56 °C durante 30 s.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de RT-PCR tiempo real. Los resultados obtenidos con los iniciadores específicos a los viroides CEVd, HSVd y CDVd utilizando los controles positivos fueron satisfactorios. En el caso de CEVd, el umbral de amplificación (Ct) fue rebasado a los 21, 22, 31 y 33 ciclos para las combinaciones de iniciadores (tratamientos) 1, 2, 3 y 4 respectivamente; para HSVd el umbral se rebasó a los 22, 24, 27 y 28 ciclos correspondiendo a los tratamientos 5, 7, 6 y 8; y para CDVd, los valores de Ct fueron 31 y 35 ciclos para los tratamientos 9 y 10 respectivamente (Figura 1). De las cuatro combinaciones de iniciadores utilizadas para CEVd y cuatro para HSVd, dos combinaciones para CEVd y dos para HSVd formaron dímeros de iniciadores de acuerdo con las curvas de disociación (datos no mostrados) lo cual en algunos casos ocasionó una amplificación inespecífica. En el caso de los 3 viroides los controles negativos no rebasaron los umbrales de fluorescencia. Para el análisis de las 90 muestras, se seleccionaron los pares de iniciadores que tuvieron el menor umbral de amplificación (Ct) para cada viroide sin formación de dímeros, en el caso de exocortis se seleccionó la combinación CEVd-5/CEVd-F (tratamiento 1) con un Ct de 21, para cachexia se escogió HSVd-b/CVdII-H1 (tratamiento 5) con un Ct de 22 y para CVd-III la combinación CVd-IIIC/CVd-IIIF (tratamiento 9) con un Ct de 31. La temperatura de anillamiento adecuada para CEVd fue de 56 °C, y para HSVd y CDVd fue de 58 °C; dichas temperaturas funcionaron de manera adecuada para cada uno de los ensayos con los iniciadores seleccionados para cada viroide. Los resultados anteriores coinciden con los trabajos hechos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009), en la utilización del RT-PCR en tiempo real con SYBR Green como método de detección de viroides de los

previous except that the annealing temperature was 56 °C for 30 s.

RESULTS AND DISCUSSION

Standardization of real-time RT-PCR. The results obtained with the primers specific to CEVd, CDVd and HSVd viroids using the positive controls, were satisfactory. For CEVd, the amplification threshold (Ct) was exceeded at 21, 22, 31 and 33 cycles for the primers combinations (treatments) 1, 2, 3 and 4 respectively; for HSVd, the threshold was exceeded at 22, 24, 27 and 28 cycles corresponding to treatments 5, 7, 6 and 8; and for CDVd, Ct values were 31 and 35 cycles for treatments 9 and 10 respectively (Figure 1). From the four primers combinations used for HSVd, and four combinations for CEVd, two of them for CEVd and two for HSVd formed dimers of the primers according to the dissociation curves (data not shown) which in some cases resulted in a non specific amplification. In the case of the 3 viroids, negative controls did not exceed the threshold fluorescence. For the 90 samples analyses, primer pairs with the lowest amplification threshold (Ct) for each viroid without dimer formation were selected; in the case of exocortis, the combination CEVd-5/CEVd-F (treatment 1) with a Ct of 21 was selected; for cachexia, HSVd-b/CVdII-H1 (treatment 5) with a Ct of 22 was chosen and for CVd-III the combination CVd-IIIC/CVd-IIIF (Treatment 9) with a Ct of 31. The annealing temperature suitable for CEVd was 56 °C, and for CDVd and HSVd was 58 °C; such temperatures functioned properly for each of the tests with the primers selected for each viroid. These results coincide with the work done by Tessitori *et al.* (2005) and Rizza *et al.* (2009), about the use of real-time RT-PCR with SYBR Green as detection method for citrus viroids. However, one of the differences of this study was the use of a real time RT-PCR kit in a single step unlike the kit used by the authors mentioned above which used two steps. Therefore, the protocol used here is faster and less likely to contaminate the samples, in addition that the primers used in this work were different from those reported by Tessitori *et al.* (2005) and Rizza *et al.* (2009). In this work it was also possible to obtain the same thermal program for CDVd and HSVd viroids, which can be used for simultaneous analysis of both viroids reducing the detection time.

Analysis of field samples. Regarding multiple end point RT-PCR reactions, from the 90 samples of different citrus species collected in Nuevo Leon and Tamaulipas states, it was clear the CEVd detection, but not CDVd nor HSVd, because the products obtained from the reactions with the primers used were merged together in the gel because they have similar size, although it was possible to differentiate them. From the 90 samples collected and analyzed, 37 were positive for CEVd, 38 to HSVd and 44 to CDVd using conventional multiple RT-PCR (Table 3); however, when corroborating results by RT-PCR with SYBR Green system, it was observed a difference in one sample for CEVd and another one for CDVd, resulting 36 and 43 samples positive, respectively (Figure 2). As for HSVd, the results obtained were the same for both protocols.

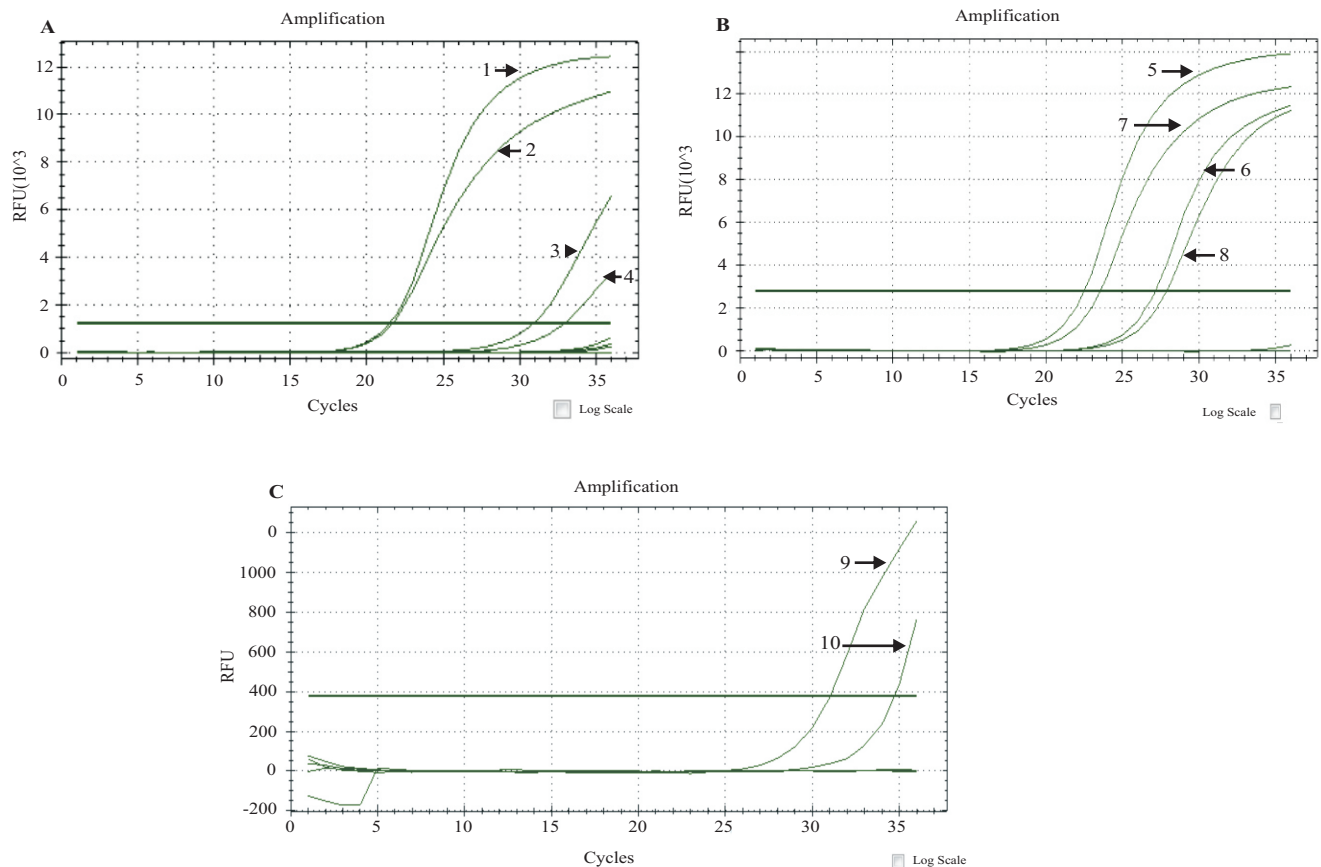


Figura 1. RT-PCR tiempo real con SYBR Green utilizando controles positivos y diferentes combinaciones de iniciadores. A. CEVd: 1. CEVd-5/CEVd-F; 2. CEVd-F/CEVd-b; 3. CEVd-7/CEVd-b; 4. CEVd-5/CEVd-7. B. HSVd: 5. HSVd/HSVdII-H1; 6. CCaVd-der/HSVdII-H1; 7. HSVd-b/CV2-AP(+) y 8. CCaVd-der/CV2-AP (+). C. CDVd: 9. CVdIII-C/CVdIII-F y 10. CVdIII-F/CVdIII-R.

Figure 1. Real time RT-PCR with SYBR Green using positive controls and different primers combinations. A. CEVd: 1. CEVd-5/CEVd-F; 2. CEVd-F/CEVd-b; 3. CEVd-7/CEVd-b; 4. CEVd-5/CEVd-7. B. HSVd: 5. HSVd/HSVdII-H1; 6. CCaVd-der/HSVdII-H1; 7. HSVd-b/CV2-AP(+) and 8. CCaVd-der/CV2-AP (+). C. CDVd: 9. CVdIII-C/CVdIII-F and 10. CVdIII-F/CVdIII-R.

cítricos. Sin embargo una de las diferencias del presente estudio fue la utilización de un kit de RT-PCR en tiempo real en un solo paso a diferencia de los utilizados por los autores antes mencionados los cuales utilizaron kit en dos pasos. Por lo tanto, el protocolo aquí utilizado es más rápido y tienen menos probabilidad de contaminarse las muestras, además de que los iniciadores aquí utilizados fueron diferentes a los referidos por Tessitori *et al.* (2005) y Rizza *et al.* (2009). En este trabajo también se logró obtener un mismo programa térmico para los viroides HSVd y CDVd el cual pudo ser utilizado en análisis simultáneos de ambos viroides reduciendo el tiempo de detección.

Análisis de muestras de campo. Con respecto a las reacciones de RT-PCR múltiple punto final, de las 90 muestras de diferentes especies de cítricos colectadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, fue clara la detección de CEVd, pero no de HSVd ni de CDVd, ya que los productos obtenidos de las reacciones con los iniciadores utilizados, se empalmaron en el gel debido a que tienen una talla similar aunque si fue posible diferenciarlos. De las 90

In general, the CDVd viroid was present more frequently and with the highest distribution in the study areas, which can be explained by the lack of regulation in Mexico for this viroid; however, CEVd and HSVd viroids also had a high frequency in the samples under study, despite being regulated by the Mexican Official Standards.

CONCLUSIONS

Areal time RT-PCR protocol with SYBR Green system was developed; it is fast, specific and sensitive for the detection of CEVd, HSVd and CDVd citrus viroids. The CEVd-5/CEVd-F; HSVd-b/CVdII-H1 and CVdIII-C/CVdIII-F primers combinations, produced the best results for CEVd, HSVd and CDVd viroids detections, respectively, by using real time RT-PCR with the SYBR Green system. The analysis of 90 citrus samples by multiple end point RT-PCR and real-time RT-PCR with SYBR Green, produced minimal differences in the viroid's detection with differences in only two samples. In the study sites, the trials showed higher incidence of CDVd with

muestras colectadas y analizadas, 37 resultaron positivas a CEVd, 38 a HSVd y 44 a CDVd utilizando la RT-PCR múltiple convencional (Cuadro 3), sin embargo al ser corroboradas mediante el sistema de RT-PCR con SYBR Green se observó una diferencia de una muestra para CEVd y una para CDVd, resultando 36 y 43 muestras positivas respectivamente (Figura 2). En el caso de HSVd, los resultados obtenidos fueron los mismos con ambos protocolos.

En general, el CDVd fue el viroide presente con mayor frecuencia y distribución en las regiones de estudio, lo cual puede explicarse por la falta de regulación en México para este viroide, sin embargo los viroides CEVd y HSVd también tuvieron una frecuencia alta en las muestras de estudio, a pesar de estar regulados por las Normas Oficiales Mexicanas.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un protocolo de RT-PCR en tiempo real con el sistema SYBR Green, rápido, específico y sensible para la detección de los viroides de cítricos CEVd, HSVd y CDVd. Las combinaciones de iniciadores CEVd-5/CEVd-F; HSVd-b/CVdII-H1 y CVdIII-C/CVdIII-F, dieron los mejores resultados para la detección de los viroides CEVd, HSVd y CDVd respectivamente, mediante RT-PCR tiempo real con el sistema SYBR Green. El análisis de 90 muestras de cítricos por RT-PCR múltiple punto final y RT-PCR tiempo real con SYBR Green, tuvieron diferencias mínimas en la detección de los viroides variando sólo en dos muestras. En las localidades de estudio, los ensayos mostraron una mayor incidencia del CDVd con un 49 % del total de muestras analizadas, seguido de 42 % para HSVd y 41 % para CEVd.

Agradecimientos. A la Fundación Produce Tamaulipas proyecto clave: PRECI 3557449^a y al proyecto de Fortalecimiento de Cuerpos Académicos de la SEP por el financiamiento. Al laboratorio Biociencia S. A. de C. V. por facilitar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación.

49 % of all samples analyzed, followed by 42 % for HSVd and 41 % for CEVd.

Acknowledgements. To Fundación Produce Tamaulipas project code: PRECI 3557449^a and to Fortalecimiento de Cuerpos Académicos (SEP) funding. To Laboratorio Biociencia S. A. de C. V. for providing their facilities to carry out this research project.

LITERATURACITADA

- Almeyda LIH, Iracheta CMM, Jasso AJ, Curti DSA, Ruiz BP and Rocha PMA. 2002. Re-examination of citrus viroids in tahiti lime in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 152-160.
- Almeyda LIH, Rocha PMA, Iracheta CMM, Orona CF y Kahlke CJ. 2005. Método simple para la detección múltiple de viroides de cítricos. *Agrociencia* 41: 87-93.
- Alvarado GOG, Rocha PMA, Silva VS, Martínez SJP, Lee RF, Rivera BR and Ruiz BP. 2000. Citrus Exocortis and Citrus Cachexia Viroids in Commercial Groves of Tahiti Lime in México. Pp:289-293. *In: da Graca JV, Lee RF and Yokomi RK (eds.). Proceedings of the 14th IOC Conference.* Riverside, CA. 436p.
- Bagherian SSA and Izadpanah K. 2010. Two novel variants of hop stunt viroid associated with yellow corky vein disease of sweet orange and split bark disorder of sweet lime. Pp:105-113. *In: 21st International Conference on Citrus Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruits Crops.*
- Bernard L and Duran Vila N. 2005. An improvement protocol for extraction and RT-PCR detection of citrus viroids. Pp:452-455. *In: Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). Proceedings of the 16th IOC Conference.* Riverside, CA. 517p.
- Diener TO. 1979. Viroids and Viroid Diseases. Editorial Wiley-Interscience. 245 p.
- Duran Vila N, Pina JA, Ballester JF, Juarez J, Roistacher CN, Rivera BR and Semancik JS. 1988. The citrus exocortis disease: a complex of viroid RNAs. *In: Timmer LW, Garnsey SM and Navarro L (eds.).*

Cuadro 3. Incidencia de tres viroides en muestras de cítricos colectadas en varias localidades de los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México.

Table 3. Incidence of three viroids from citrus samples collected at various locations in Nuevo Leon and Tamaulipas states, Mexico.

Estado	Municipio	No. de muestras	Muestras positivas (No/%)		
			CEVd	HSVd	CDVd
Nuevo León	Gral. Terán	26	10/38.5	12/46.2	12/46.2
	Marín	19	2/10.5	0/0	2/10.5
	Montemorelos	10	4/40	10/100	9/90
Tamaulipas	Cd. Victoria	9	2/22.2	4/44.4	4/44.4
	Miguel Hidalgo	21	18/85.7	10/47.6	16/76.2
	RíoBravo	5	1/20	2/40	1/20
Total		90	37/41	38/42	44/49

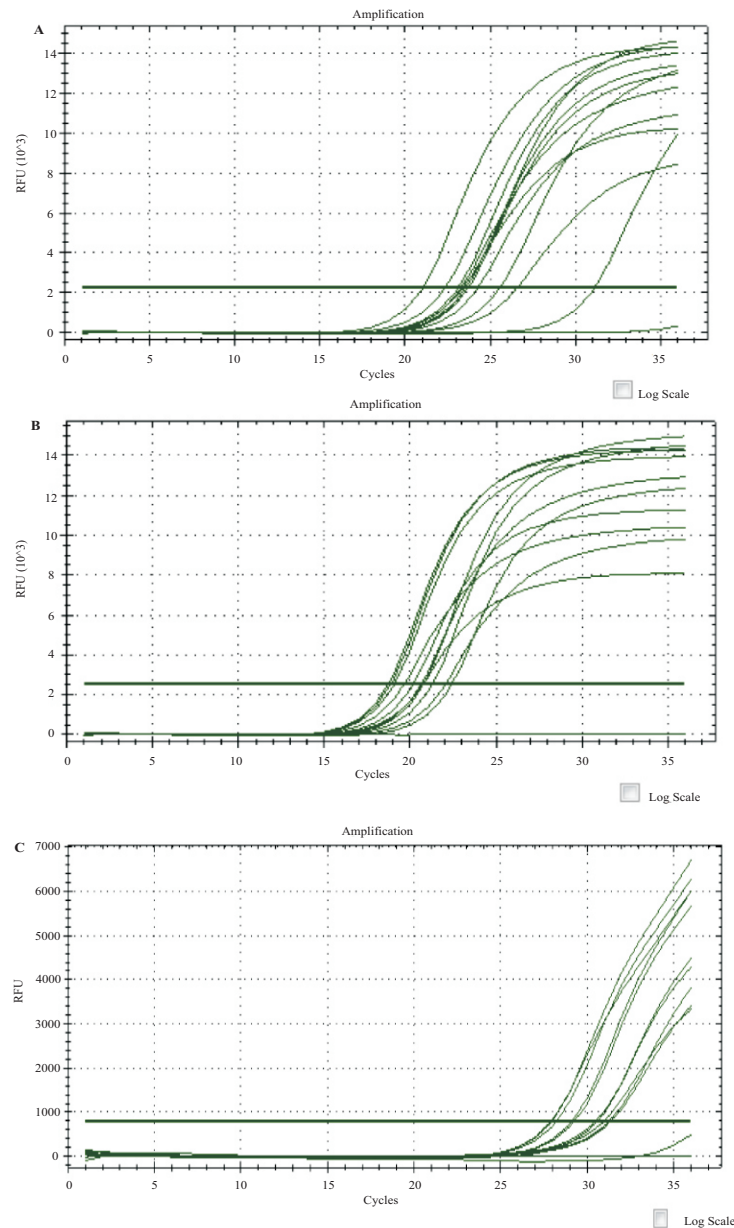


Figura 2. RT-PCR tiempo real con SYBR Green en muestras de cítricos de campo. A. CEVd. B. HSVd. C. CDVd. Cada curva sigmoide corresponde a una muestra de campo.

Figure 2. Real-time RT-PCR with SYBR Green in field citrus samples. A. CEVd. B. HSVd. C. CDVd. Each sigmoid curve corresponds to a field sample.

Proceedings of the 10th IOCV Conference. Riverside, CA. 428p.

Flores R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallest known viral RNA: the viroid. C. R. Acad. Sci. III 324: 943-952.

Gross HJ, Krupp G, Domdey H, Raba M, Jank P, Lossow C, Alberty H, Ramm K and Sanger HL. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroids. European Journal Biochemistry 121:249-257.

Hadidi A, Flores R, Randles WJ and Semancik SJ. 2003. Viroids. CSIRO Publishing. 392p.

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

Levy L and Hadidi A. 1993. Direct nucleotide sequencing of PCR amplified DNAs of the closely related citrus viroids Ila and Ilb (Cachexia). Pp. 180-186. In: Moreno P, da Graça JV and Timmer LW (eds.). Proceedings 12th Conference IOCV, Riverside, CA. 471p.

Malfitano M, Barone M, Duran Vila N and Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of campania, southern Italy. Journal of Plant Pathology 87:

- 115-121.
- Mohamed ME, Bani HSM, Dafalla G, Bove JM and Duran Vila N. 2009. Occurrence and identification of citrus viroids from Sudan. *Journal of Plant Pathology* 91: 185-190.
- Önelge N. 2010. Citrus viroids in Turkey. Pp. 225-226. *In*: Hilf ME, Timmer LW, Milne RG and da Graça JV (eds.). *Proceedings of the 17th Conference IOCV*, Riverside, CA. 275p.
- Palacio BA, Foissac X and Duran Vila D. 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *European Journal of Plant Pathology* 105: 897-903.
- Rizza S, Nobile G, Tessitori M, Catara A and Conte E. 2009. Real time RT-PCR assay for quantitative detection of Citrus viroid III in plant tissues. *Plant Pathology* 58: 118-185.
- Sano T, Hataya T and Shikata E. 1988. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from Etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Research* 16:347.
- Sieburth PJ, Irely M, Garnsey SM and Owens RA. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. Pp. 230-239. *In*: Duran Vila N, Milne RG, and da Graça JV (eds.). *Proceedings of the 15th IOCV Conference*. Riverside, CA. 456p.
- Tessitori M, Rizza S, Reina A and Catara A. 2005. Real-Time RT-PCR based on SYBR-Green I for the detection of citrus exocortis and citrus cachexia diseases. Pp. 456-459. *In*: Hilf ME, Duran Vila N and Rocha PMA (eds.). *Proceedings of the 16th IOCV Conference*. Riverside, CA. 517p.
- Timmer LW, Garnsey SM and Graham JH. 2000. *Compendium of Citrus Diseases*. 2nd edition. The American Phytopathological Society. 88 p.
- USDA. 2012. CITRUS: World markets and trade. <http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf> (consulta julio de 2012).
- Verniere C, Perrier X, Dubois C, Dubois A, Botella L, Chabrier C, Bové JM and Duran Vila N. 2006. Interactions between citrus viroids affect symptom expression and field performance of clementine trees grafted on trifoliate orange. *Phytopathology* 96: 356-368.
- Vidalakis G, Gumpf DJ, Bash JA and Semancik JS. 2004. Finger print of *Poncirus trifoliata*: A specific interaction of a viroid, a host and irrigation. *Plant Disease* 88: 709-713.
- Wang X, Zhou C, Tang K, Zhou Y and Li K. 2009. A rapid one-step multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of five citrus viroids in China. *European Journal Plant Pathology* 124: 175-180.