

MÉTODO SIMPLE PARA LA DETECCIÓN MÚLTIPLE DE VIROIDES DE CÍTRICOS

A SIMPLE METHOD FOR THE MULTIPLE DETECTION OF CITRUS VIROID

Isidro H. Almeyda-León¹, Mario A. Rocha-Peña¹, M. Magdalena Iracheta-Cárdenas¹, Fermín Orona-Castro¹, Craig J. Kahlke²

¹INIFAP/UANL. Unidad de Investigación en Biología Celular y Molecular. Apartado Postal 128-F. Ciudad Universitaria. 66450. San Nicolás de los Garza, Nuevo León. (rocha.mario@inifap.gob.mx; mrocha@fcb.uanl.mx). ²Texas A&M University. Citrus Center. 312 N. International Blvd. Weslaco, Texas 78596. USA.

RESUMEN

La detección de viroides mediante RT-PCR en México es de uso común en los laboratorios de acreditación para determinar la calidad sanitaria de plantas de cítricos, cuando se van a utilizar árboles madre para propagar plantas de vivero. En el presente trabajo se describe una metodología simple para la detección múltiple de los viroides *Citrus exocortis viroid* (CEVd), CVd II, y *Citrus viroid* III (CVd III) en una sola reacción de RT-PCR. La extracción de ácidos nucleicos se efectuó con cantidades mínimas (250 mg) de tejido, y adicionando 1% polivinilpirrolidona en la solución salina de extracción de glicina-fosfato. La detección de los tres viroides fue exitosa cuando las reacciones de RT se efectuaron con 2.0 µg de ARN, 1.0-1.5 mM de dNTP's, 0.90 µM, del iniciador complementario (C) para CEVd, y 0.49 µM para los correspondientes iniciadores C para CVd II y CVd III, respectivamente, seguidas por reacciones de PCR con 2-4 µL de cADN procedente de RT y 10, 5, 5 pmoles del juego de iniciadores homólogos (H) y C para CEVd, CVd II y CVd III. Al usar menos de 1.0 µM de dNTP's, así como cantidades iguales de los iniciadores C en las reacciones de RT y cantidades iguales del juego de iniciadores C y H para CEVd and CVd II y CVd III en las reacciones de PCR, proporcionaron detección simultánea confiable para CVd II y CVd III, pero resultados erráticos con CEVd.

Palabras clave: *Citrus cachexia*, *citrus exocortis*, extracción de ácidos nucleicos, polivinilpirrolidona.

INTRODUCCIÓN

En México es común la ocurrencia de viroides en las plantaciones adultas de cítricos (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000; Rocha-Peña *et al.*, 1995). En estudios efectuados en los Estados de Nuevo León y Tamaulipas, en el noreste de México, se detectó al viroide exocortis (*Citrus exocortis viroid*=CEVd) en alrededor del 50% de árboles de naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), toronja (*Citrus paradisi* Macf.), mandarina (*Citrus*

ABSTRACT

RT-PCR for viroid detection is commonly used by certified laboratories in México to determine sanitary quality of citrus plants, when donor trees are to be used to propagate plants in nursery. This paper describes a simple methodology for multiple detection of the viroids *Citrus exocortis viroid* (CEVd), CVd II and *Citrus viroid* III (CVdIII) in a single RT-PCR reaction. Nucleic acids were extracted with minimum quantities of tissue (250 mg) and 1% polyvinylpyrrolidone was added to a saline extraction solution of glycine-phosphate. Detection of the three viroids was successful when the RT reactions were performed with 2.0 µg of RNA, 1.0-1.5 mM of dNTPs, 0.90 µM of the complementary primer (C) for CEVd, and 0.49 µM for the corresponding C primers for CVd II and CVd III, respectively, followed by PCR reactions with 2-4 µL of cDNA from RT and 10, 5, 5 pmols of the set of homologous (H) and C set of primers for CEVd, CVd II and CVd III. The use of less than 1.0 µM of dNTPs and equal quantities of the C primers in the RT reactions and equal quantities of both C and H primers for CEVd and CVd II and CVd III in the PCR reactions provided reliable simultaneous detection for CVd II and CVd III, but erratic results with CEVd.

Key words: *Citrus cachexia*, *citrus exocortis*, nucleic acid extraction, polyvinylpyrrolidone.

INTRODUCTION

In México, the occurrence of viroids in adult plantations of citrus is common (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000; Rocha-Peña *et al.*, 1995). In studies conducted in the States of Nuevo León and Tamaulipas, in northeast Mexico, the viroid exocortis (*Citrus exocortis viroid*=CEVd) was detected in around 50% of the sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.), mandarin orange (*Citrus reticulata* Blanco), and mandarin hybrid trees through the use of the indicator plant Etrog citron (*Citrus medica* L.) (Robles-Serna, 1985; Sánchez-Salas *et al.*, 1979). The presence of citrus exocortis viroid in citrus groves is often

reticulata Blanco) e híbridos de mandarina, mediante el empleo de la planta indicadora cidra Etrog (*Citrus medica* L.) (Robles-Serna, 1985; Sánchez-Salas *et al.*, 1979). La presencia del viroide exocortis en las plantaciones frecuentemente pasa desapercibida debido a la ausencia de síntomas en los árboles injertados en el patrón de naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) de uso generalizado en todo el país. En contraste, en árboles de limón Persa o lima Tahití (*Citrus latifolia* Tan.) de la mayoría de las regiones productoras de México, frecuentemente hay síntomas severos de agrietado de las ramas y tronco, lo cual conduce al deterioro y bajos rendimientos de las plantaciones. Estos síntomas se han asociado con la presencia del CEVd y de los viroides CVd II y *Citrus viroid* III (CVd III) (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000). En las plantaciones de limón Persa injertadas en patrón macrofila (*C. macrophylla* Webster), infectadas por viroides (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000) es frecuente observar árboles de tamaño reducido con lesiones de color café en la madera justo abajo del sitio del injerto (Alvarado-Gómez *et al.*, 2000), los cuales son típicos de los síntomas reportados para la enfermedad conocida como cachexia (Roistacher, 1988, 1991). Se ha demostrado que la cachexia de los cítricos es causada por los viroides CVd Iib o CVd Iic, los cuales son variantes de viroide del enanismo del lúpulo (*Hop stunt viroid*=HSVd) (Reanwarakorn y Semancik, 1999). El presente trabajo presenta un protocolo simple para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR en una sola reacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tejido de cítricos

Se emplearon muestras de limón Persa infectadas con CEVd, CVd II y CVd III procedentes de cuatro localidades del país (Almeyda-León *et al.*, 2002), así como muestras de tejido tierno de cítricos de la colección de variedades del Campo Experimental General Terán del INIFAP, Estado de Nuevo León. Se emplearon como testigos plantas indicadoras de cidra Etrog y mandarina Parson's Special sanas y coinfectadas con CEVd, CVd II y CVd III.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se hizo mediante el método simplificado de Almeyda-León *et al.* (2003), macerando 250 mg de tejido en nitrógeno líquido. El tejido extraído se vertió en un tubo de microcentrífuga y se adicionó 1.13 mL solución GPS 2X (glicina 0.2M, Na₂HPO₄ 0.1M, NaCl 0.6M, pH 6), la cual contenía 1% polivinilpirrolidona (Sigma PVP-40), 16 µL SDS 10%, 16 µL 2-mercaptoethanol, 150 µL fenol (equilibrado con 0.1 M Tris, pH 8.0+0.1% 8-hidroxiquinolina) y 163 µL de Sevag (24:1 cloroformo-

overlooked because of the absence of symptoms in trees grafted on sour orange rootstock (*Citrus aurantium* L.), which is in general use throughout the country. In contrast, Tahiti lime (*Citrus latifolia* Tan.) trees in most of the producer regions of México exhibit severe symptoms of cracking in branches and trunk, leading to deterioration and low yields in the plantations. These symptoms have been associated with the presence of CEVd and with the viroids CVd II and *Citrus viroid* III (CVd III) (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000). In Tahiti lime grafted onto alemow (*C. macrophylla* Webster) rootstock infected by viroids (Almeyda-León *et al.*, 2002; Alvarado-Gómez *et al.*, 2000), very often there are reduced tree size with brown lesions in the wood just below the site of the graft (Alvarado-Gómez *et al.*, 2000), which are typical of the symptoms reported for the disease known as cachexia (Roistacher, 1988, 1991). It has been demonstrated that citrus cachexia is caused by the viroids CVd Iib or CVd Iic, which are variants of the *Hop stunt viroid* (HSVd) (Reanwarakorn and Semancik, 1999). This paper presents a simple protocol for the detection of citrus viroids with RT-PCR in a single reaction.

MATERIALS AND METHODS

Citrus tissue

Tahiti lime samples infected with CEVd, CVd II AND CVd III from four different locations of the country were used (Almeyda-León *et al.*, 2002), as well as samples of new flush tissue from the collection of citrus variety of the INIFAP Experimental Station at General Terán, State of Nuevo León, México. Healthy citron (*Citrus medica* L.) and Parson's Special mandarin, both healthy or coinfecting with CEVd, *Hop stunt viroid* (CVd II) and CVd III were used as controls.

Nucleic acid extraction

Nucleic acids were extracted using a simplified method developed by Almeyda-León *et al.* (2003), in which 250 mg of tissue was macerated in liquid nitrogen. Extracted tissue was poured into a microcentrifuge tube to which was added 1.13 mL of GPS 2X solution (glycine 0.2M, Na₂HPO₄ 0.1M, NaCl 0.6M, pH 6), containing 1% polyvinylpyrrolidone (Sigma PVP-40), 16 µL SDS 10%, 16 µL 2-mercaptoethanol, 150 µL phenol (equilibrated with 0.1 M Tris, pH 8.0+0.1% 8-hydroxyquinoline), and 163 µL Sevag (24:1 chloroform-isoamyl alcohol). The mixture was thoroughly homogenized and then centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4 °C. The supernatant was transferred into another microcentrifuge tube to which was added an equal volume of Sevag. The mixture was centrifuged, the supernatant was removed, and 3 volumes of cold ethanol +0.1 volume of sodium acetate 3 M were added. The sample

alcohol isoamílico). La mezcla se homogenizó y centrifugó a 5000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de microcentrífuga y se adicionó una cantidad igual de Sevag. La mezcla se centrifugó, se eliminó el sobrenadante, y se adicionaron tres volúmenes de etanol frío +0.1 volumen de acetato de sodio 3 M. La extracción se almacenó a -70 °C por 1 h y se centrifugó a 5000 rpm por 30 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 70% etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado conteniendo el extracto de ácidos nucleicos se re-suspendió en 80 μ L agua DEPC. Los ácidos nucleicos se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, se tiñeron con una solución de 0.5 mg mL⁻¹ de bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Sambrook *et al.*, 1989).

RT-PCR individual

Las muestras de ácidos nucleicos se analizaron mediante RT-PCR, con un juego de iniciadores diseñados para los viroides CEVd, CVd II y CVd III (Palacio-Bielsa *et al.*, 1999). Las secuencias para los iniciadores homólogos (H) y complementarios (C) son: CEVd (H) = 5'GGA AAC CTG GAG GAA GTC G; CEVd (C) = 5'CCG GGG ATC CCT GAA GGA; CVd II (H) = 5'CGC CCG GGG CAA CTC TTC TCA GAA TCC; CVd II (C) = 5'GCC CCG GGG CTC CTT TCT CAG GTA AG; CVd III (H) = 5' GGC AGC TAA GTT GGT GAC GC; CVd III (C) = 5'TTC GTC GAC GAC GAC AGG TA. Las reacciones de RT-PCR individuales se hicieron según la metodología de Almeida-León *et al.* (2002, 2003).

RT-PCR multiplex

En las reacciones de RT se utilizaron 2 μ g ARN. Se evaluaron dNTP a concentraciones de 0.5, 1.0 y 1.5 μ M. Los iniciadores C se utilizaron a concentraciones de 0.49 y 0.90 μ M para CEVd, y 0.49 μ M para CVd II y CVd III. La mezcla se calentó a 94 °C por 3 min, se colocó en hielo por 2 min y se conservó 30 min a temperatura ambiente. En las reacciones de PCR los iniciadores H y C se evaluaron a 5 y 10 pmoles para CEVd y 5 pmoles para CVd II y CVd III. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 94 °C por 2 min, 35 ciclos (94 °C por 30 seg para desnaturalización, 50 °C por 30 seg para el alineamiento y 72 °C por 30 seg para amplificación) y un ciclo de extensión a 72 °C por 10 min. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 6%, se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y se visualizaron en un transiluminador de luz UV (Sambrook *et al.*, 1989). Ocasionalmente los geles se tiñeron con nitrato de plata (Igloi, 1983).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La detección simultánea de CEVd, CVd II y CVd III en una sola reacción se logró cuando las reacciones de RT se efectuaron con 2 μ g ARN, 1.0 ó 1.5 mM dNTP, 0.90 μ M del iniciador C para CEVd y 0.49 μ M

was kept at -70 °C for 1 h, and subjected to centrifugation at 5000 rpm for 30 min at 4°C. The supernatant was then discarded and the precipitate was washed twice with 70% ethanol and allowed to dry at room temperature. Finally, the precipitate containing the nucleic acid extract was re-suspended in 80 μ L of DEPC water. Nucleic acid extracts were subjected to electrophoresis on 0.8% agarose gels, stained with 0.5 mg mL⁻¹ of ethidium bromide solution, and visualized in a UV light transilluminator (Sambrook *et al.*, 1989).

Individual RT-PCR

Citrus samples were analyzed by RT-PCR, with a set of primers designed for the citrus viroids CEVd, CVd II, and CVd III (Palacio-Bielsa *et al.*, 1999). The sequences for the homologous (H) and complementary (C) primers are: CEVd (H) = 5'CCA AAC CTG GAG GAA GTC G; CEVd (C) = 5'CCG GGG ATC CCT GAA GGA; CVd II (H) = 5'CGC CCG GGG CAA CTC TTC TCA GAA TCC; CVd II (C) = 5'GCC CCG GGG CTC CTT TCT CAG GTA AG; CVd III (H) = 5'GGC AGC TAA GTT GGT GAC GC; CVd III (C) = 5'TTC GTC GAC GAC GAC AGG TA. Individual RT-PCR were performed following the methodology of Almeida-León *et al.* (2002, 2003).

RT-PCR multiplex

In the RT reactions 2 μ g RNA were used. dNTP were evaluated at concentrations of 0.5, 1.0 and 1.5 μ M. C primers were used at concentrations of 0.49 and 0.90 μ M for CEVd, and 0.49 μ M for CVd II and CVd III. The mixture was heated at 94 °C for 3 min, put on ice for 2 min, and kept at room temperature for 30 min. In the PCR assays the H and C primers were evaluated at 5 and 10 pmols for CEVd and 5 pmols for CVd II and CVd III. PCR conditions were 1 cycle at 94 °C for 2 min, 35 cycles (94 °C for 30 s for denaturation, 50 °C for 30 s to annealing, and 72 °C for 30 s for amplification), and one extended cycle at 72 °C for 10 min. PCR amplification products were subjected to electrophoresis on 6% polyacrylamide gels, stained with 0.5 mg mL⁻¹ ethidium bromide solution, and visualized in a UV light transilluminator (Sambrook *et al.*, 1989). Occasionally, the gels were further stained with silver nitrate (Igloi, 1983).

RESULTS AND DISCUSSION

Simultaneous detection of CEVd, CVd II, and CVd III in a single reaction was achieved when the RT reactions were performed with 2 μ g RNA, 1.0 or 1.5 mM dNTP, 0.90 μ M of C primer, and 0.49 μ M for corresponding C primers for CVd II and CVd III, followed by PCR assays with 2-4 μ L cDNA from the RT 10, 5, and 5 pmols of the set of H and C primers for CEVd, CVdII and CVd III (Figure 1, Table 1). The use of less than 1.0 (0.5) μ M of dNTP in the RT reactions yielded erratic results in the detection of CEVd, and to a lesser extent in that of CVd II and CVd III

para los iniciadores C correspondientes para CVd II y CVd III, seguidos por ensayos de PCR con 2-4 μ L cADN procedentes de las RT, 10, 5 y 5 pmoles del juego de iniciadores H y C para CEVd, CVd II y CVd III (Figura 1, Cuadro 1). El empleo de cantidades menores a 1.0 (=0.5) μ M de dNTP en las reacciones de RT proporcionaron resultados erráticos en la detección de CEVd y en menor proporción para CVd II y CVd III (datos no mostrados). No hubo evidencia de cADN del CEVd en los geles de poliacrilamida cuando las condiciones de RT se efectuaron con cantidades iguales de 0.49 μ M de iniciadores C para CEVd, CVd II, y para CVd III. Asimismo, no se obtuvieron productos de amplificación de CEVd cuando se emplearon cantidades iguales de 5 pmoles de los iniciadores C y H para CEVd y CVd II y CVd III (datos no mostrados). En ninguna prueba de RT-PCR, individual o multiplex, se obtuvieron productos de amplificación con tejido procedente de plantas sanas (datos no mostrados).

En un estudio previo, mediante ensayos individuales de RT-PCR dirigidos a los cinco viroides de cítricos, se identificaron los viroides CEVd, CVd II y CVd III, en forma única o como infecciones mixtas por dos o tres viroides en la misma muestra de cítricos (Almeyda-León *et al.*, 2002). En ese trabajo se implementó un sistema para la detección simultánea de los tres viroides encontrados y se detectó claramente la presencia de infecciones mixtas por CEVd y CVd II, así como por CVd II y CVd III, pero falló para mostrar amplificación del CEVd en las muestras coinfectadas con CVd II y CVd III. Se consideró posible una concentración menor de CEVd con respecto a las alcanzadas por CVd II y CVd III (Almeyda-León *et al.*, 2002). En el presente estudio esta condición se superó (Figura 1, Cuadro 1) usando una concentración doble de iniciadores para el CEVd en las reacciones de RT y en las de PCR, en comparación con las de CVd II y CVd III. Asimismo, el empleo de 1.0 ó 1.5 μ M dNTP en las reacciones de RT incrementaron la detección simultánea de los tres viroides en una misma muestra. Se ha reportado la detección múltiple de viroides de cítricos (Levy *et al.*, 1992; Tessitori *et al.*, 2002), donde el común denominador han sido los viroides CEVd, CVd II y CVd III; sin embargo, en ninguno de ellos se ha mencionado diferencias en la concentración de los viroides implícitos en las plantas hospedantes. Aparentemente el requerimiento de una doble concentración de iniciadores del CEVd, indica una menor concentración de este viroide con respecto a CVd II y CVd III cuando estos tres viroides se encuentran coinfectando una misma planta. Al parecer, este es un fenómeno previamente no reportado para viroides de cítricos y, por consecuencia, requiere su estudio.

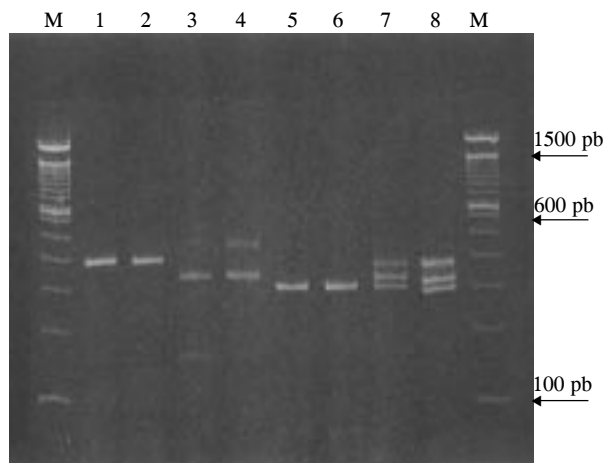


Figura 1. Detección múltiple de viroides mediante RT-PCR. M=marcador de peso molecular Ladder ADN 100. Línea 1 y 2, fragmentos de cADN amplificados de cidra Etrog infectada con CEVd; líneas 3 y 4, mandarina Parson's Special infectada con el viroide cachexia (CVd II); líneas 5 y 6, muestras de limón Persa (lima Tahití) infectadas con *Citrus viroid III*; líneas 7 y 8, muestras de limón Persa infectadas con CEVd, CVd II y *Citrus viroid III*.

Figure 1. RT-PCR multiplex for detection of citrus viroids. M=molecular marker Ladder DNA 100. Lanes 1 and 2, cDNA fragments from Etrog citron infected with CEVd; lanes 3 and 4, Parson's Special mandarin infected with cachexia (CVd II) viroid; lanes 5 and 6, Tahiti lime sample infected with *Citrus viroid III*; lanes 7 and 8, Tahiti lime samples infected with CEVd, CVd II and *Citrus viroid III*.

(data not shown). No cDNA from CEVd was visualized on the polyacrylamide gels when RT conditions were performed with equal amounts of 0.49 μ M C primers for all CEVd, CVd II, and CVd III. Likewise, no PCR amplification products of CEVd were obtained when equal amounts of 5 pmols of C and H primers were used for CEVd and CVd II and CVd III (data not shown). In none of the RT-PCR assays, individual or multiplex, were amplification products obtained with tissue from healthy plants (data not shown).

In a previous study, by using individual RT-PCR targeting the five groups of citrus viroids, CEVd, CVd II and CVd III were identified as single or mixed infections by two or three viroids in the same citrus samples (Almeyda-León *et al.*, 2002). In that study a multiplex RT-PCR system was implemented for the simultaneous detection of the three citrus viroids found, and it was clearly detected the presence of mixed infection by CEVd and CVd II, as well as by CVd II and CVd III, but it failed to show any amplification of CEVd in the samples coinfecting with both CVd II and CVd III. It was assumed that the concentration of CEVd was lower than that reached by CVd II or CVd III

Cuadro 1. Uso de RT-PCR individual y multiplex para la detección simultánea de infección por viroides en cítricos.
Table 1. Use of multiplex RT-PCR for simultaneous detection of viroid infection in citrus

Número de muestra [†]	RT-PCR individual			RT-PCR multiplex		
	CEVd	CVd II	CV III	CEVd	CVd II	CV III
V2	– [‡]	+	+	–	+	+
V4	–	+	+	–	+	+
V6	+	+	–	+	+	–
V7	+	+	–	+	+	–
V8	+	+	–	+	+	–
V9	+	+	–	+	+	–
V10	+	+	–	+	+	–
T1	+	+	–	+	+	–
T2	+	+	–	+	+	–
T3	+	+	–	+	+	–
T4	+	+	–	+	+	–
T5	+	+	–	+	+	–
C1	–	+	+	–	+	+
C2	–	+	+	–	+	+
C3	–	+	+	–	+	+
C4	+	+	+	+	+	+
C5	+	+	+	+	+	+
C6	+	+	+	+	+	+

[†] V=Veracruz; T=Tabasco; C=Colima.

[‡] += positivo; –= negativo.

Hasta ahora no se ha detectado la presencia de los viroides CVd I y CVd IV en numerosas muestras de cítricos analizadas mediante RT-PCR en México (Almeyda-León *et al.*, 2002, 2003; Almeyda-León, datos no publicados). Aunque la ocurrencia de CEVd, CVd II y CVd III es un fenómeno común en el campo (Garnsey *et al.*, 2002; Tessitori *et al.*, 1996; Sieburth *et al.*, 2002) y particularmente en plantas de limón Persa (Almeyda-León *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004; Ochoa *et al.*, 1996), la presencia potencial de los viroides CVd I (Ben-Shaul *et al.*, 1995; Pagliano *et al.*, 2000) o CVd IV (Puchta *et al.*, 1991), no se debe excluir en forma definitiva. Entonces, el protocolo de RT-PCR multiplex reportado aquí se debería considerar como primer opción para la detección simultánea de CEVd, CVd II y CVd III. Aunque se ha reportado detección múltiple mediante RT-PCR para los cinco viroides que infectan plantas de cítricos (Ike *et al.*, 2002), su utilidad en las condiciones de la citricultura de México se debería valorar y la presencia probable de CVd I o CVd IV en cualquier muestra de cítricos se debe evaluar mediante ensayos individuales de RT-PCR dirigidos a estos dos viroides en particular.

Se ha documentado que el empleo del sistema de RT-PCR en forma individual (Garnsey *et al.*, 2002; Sieburth *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1992) o multiplex (Ito *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 1992; Tessitori *et al.*, 1996) proporciona una alternativa para reducir el tiempo

(Almeyda-León *et al.*, 2002). In the present work, this condition was successfully overcome (Figure 1, Table 1) by using a two fold primer concentration for CEVd in both RT and PCR assays as compared with those of CVd II and CVd III. Likewise, the use of 1.0 or 1.5 μ M dNTP in the RT reactions enhanced simultaneous detection of the three citrus viroids in the same sample. Multiple detection of citrus viroids has been reported (Levy *et al.*, 1992; Tessitori *et al.*, 2002), where the common denominator has been the viroids CEVd, CVd II and CVd III; however, in none of these reports have differences in the implicit viroid concentrations in the host plants been mentioned. Apparently, the requirement of a double concentration of CEVd primers indicates a lower concentration of this viroid compared with those concentrations of CVd II and CVd III when these three viroids are found co-infecting a single plant. It seems that this is a previously unreported phenomenon for citrus viroids and, consequently, requires study.

We have so far been unable to find CVd I and CVd IV in numerous citrus samples analyzed by RT-PCR in México (Almeyda-León *et al.*, 2002, 2003; Almeyda-León, data unpublished). Although the natural occurrence of CEVd, CVd II and CVd III is a common phenomenon in the field (Garnsey *et al.*, 2002; Tessitori *et al.*, 1996; Sieburth *et al.*, 2002), and particularly in Tahiti lime plants (Almeyda-León *et al.*, 2002; Müller *et al.*, 2004; Ochoa *et al.*, 1966), the potential presence of CVd I (Ben-Shaul *et al.*, 1995; Pagliano *et al.*, 2000) or CVd IV (Puchta *et al.*, 1991) should not be excluded definitively. Thus, the RT-PCR multiplex system reported here should be considered as the first option for simultaneous detection of CEVd, CVd II and CVd III. Although multiple detection by RT-PCR for the five viroids that infect citrus (Ike *et al.*, 2002) has been reported, its usefulness under the citrus production conditions of México should be evaluated, and the probable presence of CVd I or CVd IV in any citrus sample should be addressed by individual RT-PCR targeting these two particular citrus viroids.

The use of RT-PCR, either individual (Garnsey *et al.*, 2002; Sieburth *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 1992) or multiplex (Ito *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 1992; Tessitori *et al.*, 1996) has been documented to provide an alternative to reduce the time and operation costs in the detection of citrus viroids in a single sample. However, regardless of its usefulness as a method of detection, the RT-PCR technique is still not 100% effective when compared with other detection methods, such as sequential polyacrylamide gel electrophoresis (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986), molecular hybridization (Palacio-Bielsa *et al.*, 1999), or biological indexing with indicator plantas (Roistacher, 1991) since

y costos de operación para detectar viroides en una misma muestra. Sin embargo, independientemente de su utilidad como método de detección, la técnica RT-PCR no es todavía 100% efectiva cuando se compara con otros métodos de detección como la electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986), la hibridación molecular (Palacio-Bielsa *et al.*, 1999) o mediante plantas indicadoras (Roistacher, 1991), ya que algunas variantes de viroides (*e.g. Citrus viroid III*) pueden escapar la detección mediante RT-PCR (Garnsey *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

Se logró la detección simultánea de CEVd, CVd II y CVd III en una sola reacción de RT-PCR.

La parte crítica de la detección múltiple de viroides mediante RT-PCR fue utilizar una cantidad doble de iniciadores complementarios y homólogos para el CEVd de los usados para CVd II y CVd III.

El empleo de cantidades menores a 1.0 (=0.5) μ M dNTP en las reacciones de RT proporcionaron resultados erráticos en la detección de CEVd y en menor proporción para CVd II y CVd III.

En ninguna prueba de RT-PCR, individual o multiplex, se obtuvieron productos de amplificación con tejido procedente de plantas sanas.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación recibió financiamiento en parte de PAICYT-UANL, Monterrey, Mexico proyecto CN 463-00. Los autores agradecen las sugerencias y comentarios de John V. da Graça en la preparación del manuscrito. Contribución INIFAP/CIRNE/A-359.

LITERATURA CITADA

- Almeyda-León, I. H., M. M. Iracheta-Cárdenas, J. J. Jasso-Argumedo, S. A. Curti-Díaz, P. Ruíz-Beltrán, and M. A. Rocha-Peña. 2002. Reexamination of citrus viroids of Tahiti lime in Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 152-160.
- Almeyda-León, I. H., M. M. Iracheta-Cárdenas, F. Orona-Castro, C. J. Kahlke, y M. A. Rocha-Peña. 2003. Extracción simple de ácidos nucleicos para la detección de viroides de cítricos mediante RT-PCR. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21: 365-370.
- Alvarado-Gómez, O. G., M. A. Rocha-Peña, S. Silva-Vara, J. P. Martínez-Soriano, R. F. Lee, R. Rivera-Bustamante, and P. Ruíz-Beltrán. 2000. Citrus exocortis and citrus cachexia in commercial groves of Tahiti lime in México. *In: Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Yokomi, R. K., J. V. da Graça and R. F. Lee (eds.). Riverside, California. pp: 289-293.
- Ben-Shaul, A., Y. Guang, N. Mogilner, R. Hadas, M. Mawassi, R. Gafny, and M. Bar-Joseph. 1995. Genomic diversity among populations of two viroids from different graft-transmissible dwarfing complexes in Israel. *Phytopathology* 85: 359-364.
- Garnsey, S. M., D. Zies, M. Irey, P. J., Sieburth, J. S., Semancik, L., Levy, and M. E., Hilf. 2002. Practical field detection of

some sequence viroid variants (*e.g. Citrus viroid III*) can escape detection by RT-PCR (Garnsey *et al.*, 2002).

CONCLUSIONS

Simultaneous detection of CEVd, CVd II and CVd III was achieved in a single RT-PCR reaction.

The critical part of multiple viroid detection with RT-PCR was to use an amount of complementary and homologous primers for CEVd double that used for CVd II and CVd III.

The use of less than 1.0 (=0.5) μ M dNTP in the RT reactions yield erratic results in the detection of CEVd and to a lesser extent for CVd II and CVd III.

In none of the RT-PCR tests, individual or multiplex, were amplification products obtained with tissue from healthy plants.

—End of the English version—



- Florida citrus viroids by RT-PCR. *In: Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Milne, R. G., N. Durán-Vila and J. V. da Graça (eds.). Riverside, California. pp: 219-229.
- Igloi, G. L. 1983. A silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Ann. Biochem.* 134: 184-188.
- Ito, T., H., Ieki, and K. Ozaki. 2002. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth.* 106: 235-239.
- Levy, L., A. Haididi, and S. M. Garnsey. 1992. Reverse-transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroides using multiplex primer sets. *Proc. Int. Soc. Citruculture* 7: 800-803.
- Müller, G. E., M. L. P. N. Targon, C. L. Medina, S. A. Carvalho, E. S. Stuchi, W. M. C. Nunes, and M. A. Machado. 2004. Viroids in commercial Tahiti lime orchards in Sao Paulo, Brazil. Program, and Abstract Book. 16th Conf. Int. Org. Citrus Virol. November 07-13, 2004. Monterrey, Nuevo León. México (Abstract No. 163).
- Ochoa, F., R. La Rosa, G. Albanese, M. Tessitori, and E. Fuggetta. 1996. Survey of citrus viroids in Venezuela. *In: Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* da Graça, J. V., P. Moreno, and R. K. Yokomi (eds.). Riverside, California. pp: 354-356.
- Pagliano, G., M. Peyrou, R. Del Campo, L. Orlando, A. Gravina, R. Wettstein, and M. Francis. 2000. Detection and characterization of citrus viroids in Uruguay. *In: Yokomi, R. K., J. V. da Graça, and R. F. Lee (eds.). Proc. 14th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 282-288.
- Palacio-Bielsa, A., X. Foissac, and N. Duran-Vila. 1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *Eur. J. Plant Pathol.* 105: 897-903.
- Puchta, H., K. Ramm, R. Luckinger, R. Hadas, M. Bar-Joseph, and H. Sanger. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVdIV), a new quimeric viroid present in dwarfed trees in Israel. *Nucleic Acid Res.* 19:6640.
- Reanwarakorn, K., and J. S. Semancik. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89: 568-574.

- Rivera-Bustamante, R. F., R. Gin, and J. S. Semancik. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Anal. Biochem.* 156: 91-95.
- Robles-Serna, R. 1985. Presencia de exocortis en los cítricos de Tamaulipas. Resúmenes XII Congreso Nacional de Fitopatología. Guanajuato, México Resumen No. 156.
- Rocha-Peña, M. A., y K. F. Byerly-Murphy. 1998. Manejo integrado de la Tristeza de los cítricos: Escenario potencial en México. *In: Memorias 1er Simposio Internacional Protección Fitosanitaria.* Hermosillo, Sonora. México. pp: 157-178.
- Rocha-Peña, M. A., J. P., Martínez-Soriano, y K. F. Byerly-Murphy. 1995. Viroides de cítricos: Amenaza oculta para la citricultura de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 13: 146-149.
- Roistacher, C. N. 1988. The cachexia and xyloporosis diseases of citrus: A review. *In: Proc. 10th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Timmer, L. W., S. M. Garnsey, and L. Navarro (eds). Riverside, California. pp: 116-123.
- Roistacher, C. N. 1991. Graft -transmissible diseases of citrus. *In: Handbook for Detection and Diagnosis.* International Organization of Citrus Virologist. FAO. Rome. pp: 115-120.
- Sánchez-Salas, J. A., R. Robles-Serna, and R. González-Garza. 1979. Ocurrencia de exocortis de los cítricos en el Estado de Nuevo León y su efecto en una combinación patrón-injerto susceptible. *Proc. Tropical Region Amer. Soc. Hort. Sci.* 23: 75-78.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and F. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
- Sieburth, P. J., M. Ireby, S. M. Garnsey, and R. A. Owens. 2002. The use of RT-PCR in the Florida citrus viroid indexing program. *In: Milne, R. G., N. Durán-Vila, and J. V. da Graça (eds.). Proc. 15th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 230-239.
- Tessitori, M., R. La Rosa, G. Albanese, and A. Catara. 1996. PCR diagnosis of citrus viroids in field samples. *In: da Graça, J. V., P. Moreno, and R. K. Yokomi (eds.). Proc. 13th Conf. Int. Org. Citrus Virol.* Riverside, California. pp: 230-235.
- Yang, X., A. Haididi, and S. M. Garnsey. 1992. Enzymatic amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82: 279-285.