

DETECCIÓN CUANTITATIVA DEL VIRUS PSOROSIS DE CÍTRICOS MEDIANTE RT-PCR TIEMPO REAL

QUANTITATIVE DIAGNOSIS OF CITRUS PSOROSIS VIRUS BY REAL TIME RT-PCR

Gabriela Barragán-Valencia¹, Alberto Morales-Loredo², M. Genoveva Álvarez-Ojeda²,
M. Ángeles Peña-del Río¹ e Isela Quintero-Zapata¹

¹Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL. Avenida Pedro de Alba y Manuel L. Barragán S/N, Cd. Universitaria. 66450, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. ²INIFAP, Centro de Investigación Regional del Noreste, Km 4.5 Carretera a Reynosa-Guadalupe, Nuevo León, México. 67100. (morales.alberto@inifap.gob.mx)

RESUMEN

La RT-PCR tiempo real es útil para detectar el virus psorosis de cítricos (CPsV) y además permite evaluar la concentración viral que se puede usar para estudiar algunos aspectos de la enfermedad. En este trabajo se implementó un protocolo de RT-PCR tiempo real para la detección cuantitativa del CPsV, por lo que se diseñó un conjunto de iniciadores y una sonda Taqman con fundamento en una secuencia de 559 bases del gen responsable de la síntesis de la proteína de la cápside del CPsV proveniente de tejido infectado de un árbol de campo. En el desarrollo de la curva estándar se obtuvo una $R^2=0.998$ de la cantidad de ARN molde con respecto a los valores de C_T y eficiencia de amplificación de 94.5%. Se determinó la concentración viral en muestras de campo y se encontró que la presencia del virus en los árboles no es uniforme; solo se detectó el virus en 40% de las muestras analizadas. También se trabajó en invernadero con una planta inoculada con el virus y se detectó el virus en cada determinación.

Palabras clave: CPsV, concentración viral, descortezamiento, manchas anulares, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

El virus psorosis de los cítricos (CPsV) consiste de una partícula espiral filamentosa de ARN de polaridad negativa, cubierta por monómeros de una proteína de 48 kDa (Derrick *et al.*, 1988) y afecta árboles de cítricos (naranja, pomelo, mandarina) pero es raro que afecte árboles de limón agrio. Este virus provoca en los árboles un descortezamiento en troncos y ramas principales, manchas en forma de anillo en hojas y frutos, pérdida de vigor y productividad. La enfermedad es de avance muy lento ya que los síntomas se manifiestan por lo menos 10 años después de la inoculación (Fawcett 1933). La psorosis se encuentra

ABSTRACT

Real time RT-PCR is useful for detecting citrus psorosis virus (CPsV) and also permits the evaluation of the viral concentration that can be used to study some aspects of the disease. In this study a protocol of real time RT-PCR was implemented for the quantitative detection of CPsV, for which a group of primers were designed along with a Taqman probe based on a sequence of 559 bases of the gene responsible for the synthesis of the capsid protein of CPsV from the infected tissue of a field tree. In the development of the standard curve, a $R^2=0.998$ was obtained of the amount of mold RNA with respect to the values of C_T and amplification efficiency of 94.5%. Viral concentration was determined in field samples and it was found that the presence of the virus in the trees is not uniform; the virus was detected in only 40% of the samples analyzed. Work was also carried out in the greenhouse with a plant inoculated with the virus, and the virus was detected in each determination.

Key words: CPsV, viral concentration, bark peeling, ring spots, RT-PCR.

INTRODUCTION

Citrus psorosis virus (CPsV) consists of a filamented spiral particle of RNA of negative polarity, covered by monomers of a protein of 48 kDa (Derrick *et al.*, 1988) and affects citrus trees (orange, pomelo, tangerine) but it rarely affects bitter lemon trees. This virus provokes bark peeling in trunks and main branches of trees, ring shaped spots in leaves and fruit, loss of vigor and productivity. The disease is of very slow advance, given that the symptoms appear at least 10 years after inoculation (Fawcett, 1933). Psorosis is found in the principal citrus regions of the world and is considered a limiting factor of production.

The traditional diagnosis of CPsV is grafting in plants, and requires 2 to 3 months to obtain results, and greenhouse space and conditions. Molecular techniques allow rapid and timely detection of the virus,

Recibido: Abril, 2007. Aprobado: Enero, 2008.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 225-232. 2008.

en las principales regiones cítricas del mundo y es considerada un factor limitante de la producción.

El diagnóstico tradicional del CPsV es el de injerto en plantas, requiere 2 a 3 meses para obtener resultados, un espacio y condiciones de invernadero. Las técnicas moleculares permiten una detección rápida y oportuna del virus, principalmente la serología y la RT-PCR (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa). Mediante RT-PCR en tiempo real se detectan virus, se evalúa la concentración viral que es un indicador del grado de infección de una enfermedad, se conoce si una infección está activa y se obtiene información de la interacción huésped-virus (Mackay *et al.*, 2002). Dado que se considera el RT-PCR en tiempo real una metodología fidedigna en la detección de patógenos que permitirá cuantificar la concentración viral del virus psorosis de cítricos, los objetivos del presente estudio fueron implementar un protocolo de RT-PCR tiempo real para la detección del CPsV y determinar concentración viral en hojas de árboles de naranja Mars afectados por psorosis en el Estado de Nuevo León (NL), México.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la huerta GT01, municipio de General Terán, NL, se tomaron muestras de hojas de 10 árboles de naranja Mars afectados por el CPsV (denominados GT01 2-15, 3-5, 3-10, 4-17, 5-14, 6-17, 10-12, 11-20, 16-11 y 16-14), con síntomas típicos de descortezamiento en el tronco y en los que previamente se detectó el CPsV mediante RT-PCR convencional. La toma de muestras en cada árbol fue al azar, el 28 de marzo del 2006. Se tomaron también muestras de una planta de invernadero de naranja Valencia inoculada con el CPsV que forma parte de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), en el Campo Experimental General Terán, NL. Estas muestras fueron el testigo y la planta estaba en condiciones de humedad y temperatura estables. Las hojas de cada árbol y de la planta testigo se lavaron, secaron y almacenaron a -20°C hasta hacer las extracciones de ARN.

Obtención de un estándar de concentración de ARN

Se extrajo ARN en hojas de la planta de invernadero y de un árbol de campo, usando el reactivo comercial TRIzol (Molecular Research Center, Inc., Monterrey, NL, México) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. En las extracciones de muestras de campo se usó 0.10 g de tejido y la pastilla de ARN obtenida se resuspendió en 30 mL de agua libre de ribonucleasas.

En la muestra de invernadero y de un árbol de campo se amplificaron, mediante la RT-PCR en un solo paso, fragmentos de 600 pb que corresponden al gen de la proteína de la cápside. Para la reacción de RT-PCR se usaron 10 μL del extracto de ácidos nucleicos, 25 μL de mezcla de reacción (solución amortiguadora con una concentración 0.4 mM de cada dNTP y 2.4 mM de MgSO_4), 12 μL de

mainly serology and RT-PCR (reverse transcription-chain reaction of the polymerase). Through real time RT-PCR, viruses are detected, an evaluation is made of the viral concentration, which is an indicator of the degree of infection of a disease, it is known whether an infection is active and information is obtained of the host-virus interaction (Mackay *et al.*, 2002). Given that RT-PCR real time is considered a reliable methodology in the detection of pathogens that will make it possible to quantify the viral concentration of the citrus psorosis virus, the objectives of the present study were to implement a protocol of real time RT-PCR for the detection of CPsV and to determine the viral concentration in leaves of Mars orange trees affected by psorosis in the state of Nuevo León (NL), México.

MATERIALS AND METHODS

In the grove GT01, municipality of General Terán, NL, samples were taken of leaves of 10 Mars orange trees affected by CPsV (named GT01 2-15, 3-5, 3-10, 4-17, 5-14, 6-17, 10-12, 11-20, 16-11 and 16-14), with typical symptoms of bark peeling in the trunk and in which CPsV had been previously detected through conventional RT-PCR. The taking of samples in each tree was random, on March 28 of 2006. Samples were also taken of a greenhouse plant of Valencia orange inoculated with CPsV which forms part of the collection of the Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), in the General Terán Experimental Field, NL. These samples were the control and the plant was under conditions of stable moisture and temperature. The leaves of each tree and the control plant were washed, dried and stored at -20°C until the extractions of RNA were made.

Obtainment of a standard of RNA concentration

RNA was extracted in leaves of the greenhouse plant and of a field tree, using the commercial reactive TRIzol (Molecular Research Center, Inc., Monterrey, NL, México) following the procedure recommended by the manufacturer. In the extractions of field samples, 0.10 g of tissue was used, and the pill of RNA obtained was resuspended in 30 mL of water free of ribonucleases.

In the greenhouse sample and that of a field, through RT-PCR in a single step, amplifications were made of fragments of 600 pb which correspond to the protein gene of the capsid. For the reaction of RT-PCR, 10 μL of the extract of nucleic acids was used, 25 μL of reaction mixture (buffer solution with a concentration 0.4 mM of each dNTP and 2.4 mM of MgSO_4), 12 μL of sterile mQ water, 1 μL of primers in solution (20 μM) and 1 μL of enzyme mixture RT/Taq Platinum[®] (Invitrogen[™]). The sequence of primers used was as follows: 5'-GCTTCTGGAAAAGCTGATG-3' for the sense primer and 5'-TCTGTTTTTGCAA CACTCC-3' for the antisense primer (Barthe *et al.*, 1998). The reaction was made in a Minicycler[™]

agua mQ estéril, 1 μL de iniciadores en solución (20 μM) y 1 μL de mezcla de enzimas RT/Taq Platinum[®] (Invitrogen[™]). La secuencia de iniciadores usados fue: 5'-GCTTCC TGGAAAAGCTGATG-3' para el iniciador en la dirección sentido y 5'-TCTGTTTTGTCAACACACT CC-3' para el iniciador en la dirección antisentido (Barthe *et al.*, 1998). La reacción se efectuó en un termociclador Minicycler[™] (MJ Research, Inc. USA). El protocolo de la reacción consistió en el paso de RT de 30 min a 50 °C seguido de una desnaturalización a 94 °C por 30 s; y luego 35 ciclos 94 °C por 15 s, 50 °C por 30 s, y 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los fragmentos amplificados se purificaron usando una matriz de sílica contenida en el kit para purificación de ADN (QIAGEN, Inc., USA). El fragmento de 600 pb obtenido de la muestra de campo se clonó en el vector TOPO PCR[®]4 y se insertó en células competentes de *Escherichia coli* TOPO TA. Se hicieron cultivos de la cepa transformada en medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Se obtuvieron paquetes celulares desde los cultivos y se hicieron extracciones de ADN plásmido (kit para purificación del ADN del plásmido QIAGEN, Inc., USA). El plásmido purificado se digirió con la enzima *Pvu* II y se hizo la transcripción *in vitro* de un fragmento híbrido de 797 pb (formado por una parte de la secuencia del vector TOPO y el fragmento de 600 pb), bajo el control de la ARN polimerasa T3. El ADN residual en el producto de la transcripción se eliminó por la adición de ADNasa I. El ARN obtenido se cuantificó usando el kit de Ribogreen (Invitrogen[™]) por fluorometría.

Diseño de iniciadores y sonda Taqman para RT-PCR tiempo real

Se obtuvieron las secuencias de fragmentos de 559 nt de la muestra de campo y de la planta de invernadero. La secuencia obtenida con la muestra de campo se analizó mediante el programa Primer Express[®] Software v2.0. Con base en los resultados de este análisis se seleccionó un conjunto de iniciadores y sonda atendiendo las características de contenido de guanina-citosina (GC), temperaturas de desnaturalización (T_m) y la no formación de dímeros. La secuencia de la sonda fue: FAMCAAGCAAAGTTGTCCTMGBNFQ, y de los iniciadores: 5'-GGGTTTGCG AGCAGTTTTCA-3' y 3'-GATTCAGGAGTTGCACC AACAG-5'. En las RT-PCR tiempo real se amplificó un fragmento de 79 pb.

Optimización de la concentración de los iniciadores y de la sonda diseñados para RT-PCR tiempo real

Se evaluaron concentraciones de sonda Taqman de 100, 150 y 250 nM, y de los iniciadores de 150, 250 y 500 nM en la RT-PCR tiempo real.

Detección cuantitativa del CPsV

En los experimentos de detección cuantitativa del CPsV se hicieron curvas estándares de RT-PCR tiempo real. Se obtuvieron curvas de calibración con cinco muestras estándar por duplicado del

(MJ Research, Inc. USA) thermocycler. The protocol of the reaction consisted of the RT step of 30 min at 50 °C followed by a denaturalization at 94 °C for 30 s, and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The amplified fragments were purified using a silica matrix contained in the kit for purification of RNA (QIAGEN, Inc., USA). The fragment of 600 pb obtained from the field sample was cloned in the vector TOPO PCR[®] 4 and was inserted in competent cells of *Escherichia coli* TOPO TA. Cultures were made of the strain transformed in Luria Bertani (LB) medium with ampicillin (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Cell packages were obtained from the cultures and extractions were made of plasmid DNA (kit for purification of plasmid DNA QIAGEN, Inc., USA). The purified plasmid was directed with the enzyme *Pvu* II and the *in vitro* transcription was made of a hybrid fragment of 797 pb (formed by a part of the sequence of the TOPO vector and the fragment of 600 pb), under the control of the RNA polymerase T3. The residual DNA in the product of the transcription was eliminated by the addition of DNAase I. The RNA obtained was quantified using the Ribogreen kit (Invitrogen[™]) by fluorometry.

Design of primers and Taqman probe for RT-PCR real time

The sequences were obtained of fragments of 559 nt of the field sample and of the greenhouse plant. The sequence obtained with the field sample was analyzed through the program Primer Express[®] Software v2.0. Based on the results of this analysis, a selection was made of a set of primers and probe attending the characteristics of guanina-citosine (GC) content, denaturalization temperatures (T_m) and the non formation of dimers. The sequence of the probe was as follows: FAMCAAGCAAAGTTGTCCTMGBNFQ, and of the primers: 5'-GGGTTTGCGAGCAGTTTTCA-3' and 3'-GATTCAGGAGTTGCACC AACAG-5'. In the real time RT-PCR, a fragment of 70 pb was amplified.

Optimization of the concentration of primers and of the probe designed for real time RT-PCR

Evaluations were made of Taqman probe concentrations of 100, 150 and 250 nM in real time RT-PCR.

Quantitative detection of CPsV

In the experiments of quantitative detection of CPsV, standard curves of real time RT-PCR were made. Calibration curves were obtained with five standard samples by duplicate of the *in vitro* transcript RNA, quantified by fluorometry of RNA concentrations: 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} and 5×10^{-6} ng; which correspond to 1.24×10^8 , 1.24×10^7 , 1.24×10^6 , 1.24×10^5 and 1.24×10^4 number of viral genome. The number of viral genome was calculated taking into account the molecular weight (MW) of the RNA *in vitro* transcript (given that its length is 797 rNTP's the MW is 241 491), and the Avogadro number.

ARN transcrito *in vitro*, cuantificado por fluorimetría de concentraciones de ARN de: 5×10^{-2} , 5×10^{-3} , 5×10^{-4} , 5×10^{-5} y 5×10^{-6} ng; que corresponden a 1.24×10^8 , 1.24×10^7 , 1.24×10^6 , 1.24×10^5 y 1.24×10^4 número de genomas virales. El número de genomas virales se calculó considerando el peso molecular (PM) del ARN transcrito *in vitro* (dado que su longitud es 797 rNTP's, el PM es 241,491), y el número de Avogadro.

Detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo

Para las reacciones de RT-PCR se utilizaron 9 mL de la extracción de ARN de plantas de campo, una concentración de sonda Taqman de 150 nM y de los iniciadores de 250 nM. Se usaron los reactivos del Mix Master Taqman Applied Biosystem para RT-PCR tiempo real para un volumen de reacción de 20 mL. La RT-PCR se hizo en un equipo 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem Inc., USA). El programa consistió en un primer paso a 50 °C por 30 min, seguido por 95 °C por 10 min y 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 15 s y extensión a 60 °C por 1 min. Se empleó una muestra de un árbol sano como testigo negativo de la RT-PCR; además se manejó un blanco (mezcla de reactivos sin ARN).

Se hicieron dos ensayos de determinación de concentración viral en los 10 árboles evaluados. En el primero se hicieron detecciones cuantitativas en tres diferentes muestras de una sola hoja de cada árbol, mientras que en el segundo las detecciones fueron en tres muestras de diferentes hojas para cada árbol. Las muestras se tomaron al azar de las hojas en cada árbol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de un control positivo para RT-PCR tiempo real

Se amplificaron los fragmentos de 600 pb del gen de la proteína de la cápside del CPsV en la muestra de campo y de la planta de invernadero mediante la reacción de RT-PCR en un solo paso. Dicho procedimiento es una simplificación del reportado por Barthe *et al.* (1998) con la ventaja de ser un protocolo más rápido y práctico.

El fragmento obtenido de la planta de invernadero se clonó en células competentes de *E. coli* usando el vector TOPO PCR®4. Su presencia en el plásmido se confirmó mediante digestión enzimática. En la transcripción del vector TOPO con el inserto se obtuvo el fragmento de ARN del tamaño esperado. Esta estrategia para obtener estándares de concentración del ARN viral como testigos de cuantificación para RT-PCR tiempo real tuvo resultados satisfactorios, al igual que en otros estudios (Laue *et al.*, 1999; Tang-Nelson and Lightner, 2001).

Las secuencias obtenidas de los fragmentos de 559 nt con la muestra de campo y de la planta de inverna-

Quantitative detection of CPsV in field samples

For the reactions of RT-PCR, 9 mL of the extraction of RNA from field plants were used, along with a Taqman probe concentration of 150 nM and 250 nM of the primers. The reagents of the Mix Master Taqman Applied Biosystem were used for real time RT-PCR for a reaction volume of 20 mL. The RT-PCR was made in a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem Inc., USA). The program consisted of a first step at 50 °C for 30 min, followed by 95 °C for 10 min and 40 denaturalization cycles at 95 °C for 15 s and extension at 60 °C for 1 min. A sample from a healthy tree was used as a negative control of the RT-PCR; in addition, a blank was used (mixture of reagents without RNA).

Two assays were made of determination of viral concentration in the 10 trees evaluated. In the first, quantitative detections were made in three different samples of a single leaf from each tree, whereas in the second the detections were in three samples of different leaves for each tree. The samples were taken randomly from the leaves in each tree.

RESULTS AND DISCUSSION

Obtainment of a positive control for real time RT-PCR

The fragments of 600 pb of the protein gene of the capsid of CPsV in the field sample and of the greenhouse plant, were amplified through the reaction of RT-PCR in a single step. This procedure is a simplification of the one reported by Barthe *et al.* (1998) with the advantage of being a faster and more practical protocol.

The fragment obtained from the greenhouse plant was cloned in competent cells of *E. coli* using the vector TPOP PCR®4. Its presence in the plasmid was confirmed by means of enzymatic digestion. In the transcription of the TOPO vector with the insert, the RNA fragmented of the expected size was obtained. This strategy for obtaining standards of the concentration of the viral RNA as quantification controls for real time RT-PCR gave satisfactory results, as in other studies (Laue *et al.*, 1999; Tang-Nelson and Lightner, 2001).

The sequences obtained from the fragments of 559 nt with the field sample and the greenhouse plant are shown in Figure 1. These two sequences have 98% similarity to each other and coincide in 547 of 559 bases. The differences between the two sequences are found in positions 28, 29, 30, 38, 39, 69, 120, 333, 334, 402, 495 and 507. The BLAST analysis of the sequences of 559 nt obtained with respect to those reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), revealed that these sequences have a greater similarity (99-96%) with those reported by Alioto *et al.* (2003)

dero se presentan en la Figura 1. Estas dos secuencias tienen 98% de similitud entre si y coinciden en 547 de 559 bases. Las diferencias entre las dos secuencias se encuentran en las posiciones 28, 29, 30, 38, 39, 69, 120, 333, 334, 402, 495 y 507. El análisis BLAST de las secuencias de 559 nt obtenidas con respecto a las reportadas en el Centro Nacional de Información de Biotecnológica (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), reveló que estas secuencias tienen una mayor similitud (99-96%) con las reportadas por Alioto *et al.* (2003) Loconsole *et al.* (2006) y Martín *et al.* (2005), pero menor (85%) con las reportadas por Sánchez *et al.* (1998) y Barthe *et al.* (1998). Esto probablemente se debe a que las secuencias se obtuvieron de ARN viral de árboles que muestran síntomas de descortezamiento en tronco y manchas en hojas jóvenes, al igual que los árboles descritos por los primeros autores. En tanto que los árboles descritos por Barthe *et al.* (1998) y Sánchez de la Torre *et al.* (1998) muestran, además del descortezamiento, manchas anulares en hojas y frutos (psorosis del tipo B según clasificación de Fawcett y Klotz, 1938)). Con base en lo anterior se puede considerar que los árboles evaluados están afectados por Psorosis A.

Es importante mencionar estos resultados por la diferencia molecular (en la secuencia de 559 nt anali-

Loconsole *et al.* (2006) and Martín *et al.* (2005), but less (85%) with those reported by Sánchez *et al.* (1998) and Barthe *et al.* (1998). This is probably because the sequences were obtained of viral RNA from trees that present symptoms of bark peeling in the trunk and spots in young leaves, as in the trees described by the first authors. However, the trees described by Barthe *et al.* (1998) and Sánchez de la Torre *et al.* (1998) show, in addition to the bark peeling, ring spots in leaves and fruits (type B psorosis according to classification of Fawcett and Klotz, 1938). Based on the above, it can be considered that the trees evaluated are affected by Psorosis A.

It is important to mention these results because of the molecular difference (in the sequence of 559 nt analyzed) between the viruses that cause the two types of psorosis. Furthermore, it is necessary to consider the differences in bases in the detection of CPsV through RT-PCR, because it affects the amplification efficiency due to differences between the primers and the blank sequence.

The BLAST analysis in NCBI of the sequence of 79 pb amplified by the protocol of real time RT-PCR, showed that it is a sequence conserved in five of the sequences that are reported in this gene bank. It has 99% similarity with nine sequences of those reported,

Figura 1. Secuencias de los fragmentos de 559 nt que corresponden al gen de la proteína de la cápside delCPsV.
Figure 1. Sequences of the fragments of 559 nt that correspond to the protein gene of the capsid of CPsV.

Muestra		Secuencia
NL [†]	1	ACAAAAGGAAAGTACCTGAATTTGTCAATCGAAAGCTGCATGATGGTGA
PS [‡]	ATC.....TA.....
NL	50	TGTAAGTTTGTCCAAAATCCGTGAGGAATTGAGTCATGCTCCAACAAAG
PS	A.....
NL	99	AAATTCCTGCAAAGGTGTTTTCAAGATTGATATAGACAACCTACCAA
PS	C.....
NL	148	GTGCTGTTGCTCTAGGTGTAAGCTGAATATTGCAGGTAATCGATCTGT
PS	
NL	197	GAGATATGCTGGGTTTGCAGCAGTTTTCAAACCAAGCAAAAAGTTGTCC
PS	
NL	246	CCTGCTGTTGGTGCAACTCCTGAATCCCTGATGCCATTGTGGAACCA
PS	
NL	295	ATCAAAAAGATTGAAAAATCAATTGCAATAAGAGATTTTCTGAAAACAAT
PS	TC.....
NL	344	GGAGGGACAATGGAAGAATCAGAAAAGGCTTCATCCTTTATCTGATGAA
PS	
NL	393	AAACCAACAATAAAAAACTTCACTCTGAAGTTGACATGTGCCATAATTT
PS	T.....
NL	442	ACAGCCTCACTCCAGATGGCAGAATTGACATGGCCGAGAGGATAATAAC
PS	
NL	491	CGACGAGAACAAGGGGTTTCAGAATGATAGAACTTCTTTGGCGATGGT
PS	A.....T.....
NL	540	GAAGGGCCAACCTAGGACATG
PS	

[†] NL: muestra de campo obtenida de un árbol en una huerta ubicada en General Terán, NL.

[‡] PS: muestra de una planta de invernadero inoculada con el CPsV. Las secuencias obtenidas en este trabajo se reportaron en NCBI los números de acceso son: EF618547 y EF618548.

zada) entre los virus que provocan los dos tipos de psorosis. Además, es necesario considerar las diferencias en bases en la detección del CPsV mediante RT-PCR, debido a que afecta la eficiencia de amplificación por diferencias entre los iniciadores y la secuencia blanco.

El análisis BLAST en NCBI de la secuencia de 79 pb amplificada por el protocolo de RT-PCR tiempo real, mostró que es una secuencia conservada en cinco de las secuencias que se reportan en este banco de genes. Tiene una similitud de 99% con nueve secuencias de las reportadas, un 98% con seis aislamientos y con sólo tres secuencias reportadas del CPsV tiene un porcentaje de similitud entre 85 y 94%. Así, es muy probable que este conjunto de iniciadores y sonda Taqman den resultados similares en la detección de otros aislamientos del CPsV.

Detección cuantitativa del CPsV en muestras de campo

En las curvas estándares R^2 fue 0.998 y la eficiencia en la amplificación fue 94.1% cada vez que se hizo la determinación, lo que indica una mayor homogeneidad (Cuadro 1 y 2). Se considera que mediante el protocolo implementado se cuantifica la concentración viral hasta un orden de 10^3 , porque cuando las muestras estándares tienen una concentración de un orden menor de 10^3 el valor de R^2 es menor a 0.98; por tanto, hay una mala correlación entre los valores de C_T y la cantidad de ARN presente en las muestras. Los valores de R^2 y eficiencia, así como el intervalo de concentraciones usadas en las muestras estándares, son equiparables con los reportados para protocolos de RT-PCR tiempo real (Laue *et al.*, 1999; Martell *et al.*, 1999 y Niesters *et al.*, 2000).

En la detección de concentración viral en el ensayo donde se usaron tres diferentes muestras de una misma

Cuadro 1. Número de genomas virales detectados en 9 mL de ARN obtenidos de tres diferentes muestras de una misma hoja para cada árbol.

Table 1. Number of viral genomes detected in 9 mL of RNA obtained from three different samples of the same leaf for each tree.

Árbol	Número de genomas virales		
	Muestra		
	1	2	3
2-15	2.79×10^4	7.60×10^3	2.20×10^4
4-17	4.98×10^4	1.06×10^5	4.86×10^3
16-11	7.40×10^3	4.23×10^2	3.30×10^3
16-14	7.88×10^3	No se detectó	8.52×10^3
Planta de invernadero	1.04×10^4	9.89×10^3	2.25×10^4

98% with six isolations and with only three reported sequences of CPsV have a percentage of similarities of between 85 and 94%. Therefore, it is very likely that this set of primers and Taqman probe give similar results in the detection of other isolates of CPsV.

Quantitative detection of CPsV in field samples

In the standard curves R^2 was 0.998 and amplification efficiency was 94.1% each time the determination was made, which indicates a greater homogeneity (Table 1 and 2). It is considered that through the implemented protocol, the viral concentration is quantified to an order of 10^3 , because when the standard samples have a concentration of an order lower than 10^3 , the value of R^2 is lower than 0.98; therefore, there is a poor correlation between the values of C_T and the amount of RNA present in the samples. The values of R and efficiency, as well as the interval of concentrations used in the standard samples, are comparable with those reported for protocols of real time RT-PCR (Laue *et al.*, 1999; Martell *et al.*, 1999 and Niesters *et al.*, 2000).

In the detection of viral concentration in the assay where three different samples of the same leaf were used for each tree, the virus was detected in four trees, but when three different samples of different leaves for each tree were used, the virus was detected in nine of the trees evaluated. Therefore, it is considered that the distribution of the virus in field trees is not uniform. For the greenhouse plant, the values of viral concentration were 10^4 and in each determination viral concentration was detected, which indicates a greater

Cuadro 2. Número de genomas virales detectados en 9 mL de ARN obtenidos de tres diferentes muestras de diferentes hojas para cada árbol.

Table 2. Number of viral genomes detected in 9 mL of RNA obtained from three different samples of different leaves for each tree.

Árbol	Número de genomas virales		
	Muestra		
	1	2	3
2-15	-	2.75×10^3	-
3-5	-	-	4.26×10^4
3-10	-	3.57×10^3	-
4-17	4.50×10^3	9.84×10^4	3.24×10^5
5-14	-	-	1.20×10^4
6-17	6.72×10^4	-	-
10-12	-	-	7.27×10^4
11-20	4.85×10^4	6.86×10^4	-
16-11	-	-	8.93×10^3
16-14	2.37×10^4	-	-
Planta de invernadero	2.57×10^4	3.37×10^4	1.86×10^4

hoja para cada árbol se detectó el virus en cuatro árboles, pero al usar tres diferentes muestras de diferentes hojas para cada árbol se detectó el virus en nueve de los árboles evaluados. Por tanto, se considera que la distribución del virus en los árboles de campo no es uniforme. Para la planta de invernadero los valores de concentración viral fueron 10^4 y en cada determinación se detectó concentración viral, lo que indica una mayor homogeneidad del virus en la planta de invernadero en comparación con los árboles de campo.

En las muestras de campo se detectó el virus en 4 de cada 10 muestras analizadas, lo que puede atribuirse a las condiciones ambientales de los tejidos afectados y al grado de desarrollo de la patología. Hay reportes de detección del virus en muestras de campo por serología (Alioto *et al.*, 1999 y Martín *et al.*, 2002), donde se señala también la dificultad de este proceso en muestras de campo.

El empleo de RT-PCR tiempo real en la detección cuantitativa del CPsV es una herramienta de estudio de la psorosis para la determinar concentración viral en árboles afectados en campo, en diferentes épocas del año, en diferentes tejidos de los árboles (corteza, madera, varetas, frutos, etc.) y variedades de cítricos.

CONCLUSIONES

Las secuencias obtenidas de 559 nt tienen una mayor similitud con las reportadas para aislamientos precedentes de árboles que muestran el síntoma de descortezamiento en troncos, pero una menor similitud con las que proceden de árboles que muestran manchas anilladas en frutos.

Se detectó una concentración viral de 10^3 a 10^5 números de genomas virales del CPsV en 9 mL del ARN obtenido.

Las determinaciones de concentración viral en árboles de campo mostraron que la distribución del virus no es uniforme en los árboles, mientras que en la planta de invernadero hay una mayor homogeneidad del virus.

En muestras de campo se obtuvo 40% de sensibilidad en la detección, mientras que para la planta de invernadero se determinó concentración viral en cada muestra analizada.

LITERATURA CITADA

- Alioto, D., M. Gangemi, S. Deaglio, P. Sposato, E. Noris, E. Luisoni, and R. G. Milne. 1999. Improved detection of citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. *Plant Pathol.* 48:735-741.
- Alioto, D., M. Malfinato, A. Troisi, A. Peluso, S. Martín, R. Milne, G. J. Guerri, and P. Moreno. 2003. Variability of the coat protein gene of citrus psorosis virus in Campania, southern Italy. *Arch. Virol.* 148(11): 2155-2166.

homogeneity of the virus in the greenhouse plant with respect to the field trees.

In the field samples, the virus was detected in 4 of every 10 samples analyzed, which can be attributed to the environmental conditions of the affected tissues and to the degree of development of the pathology. There are reports of detection of the virus in field samples using serology (Alioto *et al.*, 1999 and Martín *et al.*, 2002), where the difficulty of this process in field samples is also pointed out.

The use of real time RT-PCR in the quantitative detection of CPsV is a tool in the study of psorosis to detect viral concentration in affected field trees, in different times of year, in different tissues of the trees (bark, wood, twigs, fruits, etc.) and varieties of citrus.

CONCLUSIONS

The sequences obtained of 559 nt have a greater similarity with those reported for isolates from trees showing the symptom of bark peeling in trunks, but a lower similarity with those from trees that show ring spots in fruits.

A viral concentration of 10^3 to 10^5 numbers of viral genomes of CPsV was detected in 9 mL of the RNA obtained.

The determinations of viral concentration in field trees showed that the distribution of the virus is not uniform in the trees, while in the greenhouse plant there is more homogeneity of the virus.

In field samples 40% sensitivity was obtained in detection, whereas for the greenhouse plant viral concentration was determined in each sample analyzed.

End of the English version—



- Barthe, G., A. Ceccardi T., L. Manjunath K., and K. Derrick S. 1998. Citrus psorosis virus: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *General Virol.* 79:1531-1537.
- Derrick K., S. R. Bransky, H. da Graca J., V. Lee R., F. Timmer L., and T. Nguyen K. 1988. Partial characterization of a virus associated with citrus ringspot. *Phytopathology* 78(10):1298-1301.
- Fawcett H., S. 1933. Is psorosis of citrus a virus disease. *Phytopathology* 24:658-668.
- Fawcett H., S., and L. Klotz J. 1938. Types and symptoms of psorosis and psorosis-like diseases of citrus. *Phytopathology* 28:670 (abstr.)
- Laue, T., P. Emmerich, and H. Schmit. 1999. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J. Clin. Microbiol.* 37: 2543-2547.
- Loconsole, G., M. Castellano, M. Dell'Orco, D. Boscia, and V. Savino. 2006. Serological detection of citrus psorosis virus by a polyclonal antiserum to recombinant virus coat protein. *J. Plant. Pathol.* 88(3, Supplement): 577-578.

- Mackay, I., M. Arden K., and E. Nitsche A. 2002. Survey and summary real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30(6): 1292-1305.
- Martell, M., J. Gómez, J. Esteban, I. Sauleda S., J. Quer, B. Cabot, R. Esteban, and J. Guardia. 1999. High-throughput real-time reverse transcription-PCR quantitation of hepatitis C virus RNA. *J Clin. Microbiol.* 37:327-332.
- Martín S., D. Alioto, R. G. Milne, J. Guerri, and P. Moreno. 2002. Detection of citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection test. *Plant Pathol.* 51:134-141.
- Martín, S., C. López, M. L. García, G. Naum-Onganía, O. Grau, R. Flores, P. Moreno, and J. Guerri. 2005. The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of citrus psorosis virus: comparative analysis with other ophiioviruses. *Arch. Virol.* 150:167-176.
- Niesters, H. G., J. van Esser, E. Fries, K. Wolthers C., J. Cornelissen, and A. Osterhaus D. 2000. Development of a real-time quantitative assay for detection of Epstein-Barr virus. *J. Clin. Microbiol.* 38:712-715.
- Sánchez, de la T., M. Riva O., R. Zandomeni, O. Grau, and M. L. García. 1998. The top component of citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein. *Molecular Plant Pathol.* Disponible en: <http://www.bspp.org.uk/mppol/1998/1019sanchez/paper.htm>. Fecha de consulta: mayo del 2007.
- Tang-Nelson, K., and D. V. Lightner. 2001. Development of real-time PCR assays for detection of white spot syndrome virus, yellow head virus, Taura syndrome virus, and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus in penaeid shrimp. Disponible en: www.nmfs.noaa.gov/mblsk/saltonstallken/whitespot_final.PDF. Fecha de consulta: mayo del 2007.