

Characterization of *Citrus exocortis viroid* in different conditions of indexing

Caracterización del *Viroide exocortis de los cítricos* en diferentes condiciones de indexado

Susana Alcántara-Mendoza, Santiago Vergara-Pineda, Oscar García-Rubio, Víctor H. Cambrón-Sandoval, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Avenida de las Ciencias S/N Juriquilla, Santa Rosa Jáuregui, Querétaro, CP 76230, México; **Domingo Colmenares-Aragón***, Departamento de Cuarentena, Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. km 21.5 Carretera Amazcala-Chichimequillas, El Marqués, Querétaro, CP 76263, México; **Cristian Nava-Díaz**, Especialidad en Fitopatología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado México, CP 56230, México. *Autor para correspondencia: dca79mx@gmail.com

Recibido: 18 de Enero, 2017.

Aceptado: 13 de Abril, 2017.

Alcántara-Mendoza S, Vergara-Pineda S, García-Rubio O, Cambrón-Sandoval VH, Colmenares-Aragón D, Nava-Díaz C. 2017. Characterization of *Citrus exocortis viroid* in different conditions of indexing. Revista Mexicana de Fitopatología 35: 284-303.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1701-3

Primera publicación DOI: 01 de Mayo, 2017.

First DOI publication: May 01, 2017.

Resumen. *Citrus exocortis viroid* (CEVd) es un fitopatógeno regulado en la citricultura de México. El diagnóstico por indexado para detectar la presencia y transmisión de CEVd en material propagativo de bancos de germoplasma es de aplicación oficial. El objetivo de este estudio fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y la rapidez con que se generan los síntomas para establecer su aplicación en el diagnóstico biológico.

Abstract. *Citrus exocortis viroid* (CEVd) is a regulated pathogen in Mexican citriculture. The diagnosis by indexing to detect the presence and transmission of CEVd in propagative material of germplasm banks is of official application. The aim of this study was characterizing to CEVd by *in vitro* and *in vivo* indexing to analyzing the efficiency of the transmission and the speed with which the symptoms are generated to establish their application in the biological diagnosis. The height, incidence, area under the disease progress curve (ABCP) and transmission efficiency were evaluated in etrog citron indicator plants, cultivated *in vivo* inoculated by grafting and in buds cultivated *in vitro* inoculated with callus. The mean height of buds and infected plants was 7.5 mm and 56.3 mm less than the control, incidence, ABC and regression model were 81.2%, 10.7, $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.99$ *in vitro* y 70.8%, 9.84, $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.94$ *in vivo*, respectively. The efficiency

Se evaluó altura, incidencia, área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCP) y eficiencia de transmisión en plantas indicadoras de citron etrog cultivadas *in vivo* inoculadas por injerto y en brotes cultivados *in vitro* inoculados con callos. La altura media de brotes y plantas infectadas fue menor 7.5 mm y 56.3 mm respecto al testigo, la incidencia, ABCP y modelo de regresión fueron 81.2 %, 10.7, $y = 0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.99$ *in vitro* y 70.8%, 9.84, $y = 0.0004x^2 - 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.94$ *in vivo*, respectivamente. La eficiencia fue 99 % en ambos métodos con síntomas a partir del décimo día posterior a la inoculación *in vitro* y 40 *in vivo*. Las condiciones *in vitro* generan una rápida expresión de síntomas en el diagnóstico por indexado contribuyendo a la detección oportuna de CEVd para evitar su dispersión.

Palabras clave: cultivo de tejidos, callos, pospoviroidae, injerto, inoculación.

El viroide exocortis de los cítricos (CEVd) es un patógeno que causa síntomas reducción de crecimiento, desprendimiento y agrietamiento de la corteza, epinastia de hojas y grietas en el peciolo (Bernard *et al.*, 2009) afecta a diferentes especies de cítricos como *Poncirus trifoliata* y sus híbridos, lima rangpur (*Citrus limonia*), limón (*C. limon*) y citron etrog (*C. medica*) (Lin *et al.*, 2015a), tiene varios hospedantes como vid (*Vitis vinifera*), jitomate (*Lycopersicum esculentum*), haba (*Vicia faba*), pepino (*Cucumis sativus*), ortiga de terciopelo (*Gynura aurantiaca*), crisantemo (*Crysanthemum morifolium*), impatiens (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verbena x hybrida*) (Škorić *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis, 2014) y petunia (*Petunia* spp.) (Van Brunschot *et al.*, 2014). La transmisión del viroide se lleva a cabo por injerto de yemas infectadas en árboles sanos o de forma

of both indexing methods was 99 % with initial symptoms tenth days after the *in vitro* inoculation and 40 *in vivo*. The *in vitro* conditions generate a rapid expression of symptoms in the diagnosis by indexing contributing to the opportune detection of CEVd to avoid its dispersion.

Key words: tissue culture, callus, pospoviroid, graft, inoculation,

Citrus exocortis viroid (CEVd) is a pathogen that causes symptoms of stunting, bark sloughing and cracking, leaf epinasty and cracks in the petiole (Bernard *et al.*, 2009); it affects different species of citrus, such as *Poncirus trifoliata* and its hybrids, rangpur lime (*Citrus limonia*), lemon (*C. limon*) and citron (*C. medica*) (Lin *et al.*, 2015a), and has various hosts such as the common grapevine (*Vitis vinifera*), tomato (*Lycopersicum esculentum*), broad bean (*Vicia faba*), cucumber (*Cucumis sativus*), velvet plant (*Gynura aurantiaca*), chrysanthemum (*Crysanthemum morifolium*), impatiens (*Impatiens walleriana*), verbena (*Verbena x hybrida*) (Škorić *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2009; Palukaitis, 2014) and petunia (*Petunia* spp.) (Van Brunschot *et al.*, 2014). The transmission of the viroid was carried out by grafting infected buds in healthy trees, or mechanically (Lin *et al.*, 2015a) with the use of a cutting instrument and contaminated trimming. There is no chemical to fight this disease, and the only form of control is prevention, with the use of propagative material free of viroids (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) from germplasm banks and greenhouses that accomplish strictly with biological and molecular diagnoses (NAPPO, 2013).

The biological diagnosis by indexing is an efficient tool to test the health state of a plant regarding a disease by inoculation with the grafting

mecánica (Lin *et al.*, 2015a) a través del uso de la herramienta de corte y poda contaminada. El control químico para el combate de la enfermedad no existe y el único medio de control es la prevención con el uso de material propagativo libre de viroides (Papayiannis, 2014; Gergerich *et al.*, 2015) que provenga de bancos de germoplasma y viveros que cumplan de forma obligatoria con diagnósticos biológicos y moleculares (NAPPO, 2013).

El diagnóstico biológico por indexado es una herramienta eficiente para comprobar el estado fitosanitario de una planta respecto a una enfermedad mediante la inoculación por injerto de yema o cualquier otro tejido infectado en plantas indicadoras que permitan la replicación del viroide, la manifestación de síntomas (Roistacher, 1991; Hajeri *et al.*, 2011) y el aumento de su concentración. El indexado *in vivo* para el diagnóstico del CEVd puede durar 90 días (Malfitano *et al.*, 2005; Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a), es laborioso, requiere de invernaderos tecnificados y dificulta el análisis de grandes cantidades de plantas, lo que disminuye la posibilidad de crear nuevos bancos de germoplasma para conservar y propagar variedades sanas. Actualmente solo existen dos bancos de germoplasma en México (DGSV, 2016) que cumplen con los requisitos y diagnósticos oficiales establecidos por el SENASICA, uno de los cuales es operado por la misma institución y el otro pertenece al sector privado. Un diagnóstico rápido, exacto y confiable de una enfermedad es la base del éxito para la conservación de germoplasma, la importación, introducción y propagación comercial de yemas de cítricos libres de viroides.

El efecto de los viroides sobre el rendimiento y calidad de la cosecha de los cítricos son altamente dependientes de la especie, variedad, patrón, tipo de aislamiento viroidal y de las condiciones ambientales en que se desarrollan (Pethybridge *et al.*, 2008). El estudio de las condiciones que afectan

of the bud or any other infected tissue in indicator plants that allow the replication of the viroid, the manifestation of symptoms (Roistacher, 1991; Hajeri *et al.*, 2011) and the increase of its concentration. Indexing *in vivo* for the CEVd diagnosis can last up to 90 days (Malfitano *et al.*, 2005; Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a); it is labour intensive and requires technified greenhouses, and the analysis of large amounts of plants is complicated, which reduces the possibility of creating new germplasm banks to preserve and propagate new healthy varieties. Currently there are only two germplasm banks in Mexico (DGSV, 2016) that accomplish with the official requirements and diagnoses established by SENASICA, one of which is operated by that institution, whereas the other belongs to the private sector. A quick, accurate and reliable diagnosis of a disease is the key to success in germplasm conservation, and the import, introduction, and propagation of viroid-free citrus buds.

The effect of the viroids on the yield and quality of citrus crops are highly dependant on the species, variety, pattern, type of viral isolate, and on the environmental conditions in which they develop (Pethybridge *et al.*, 2008). The study of the conditions that affect the development of a disease help predict prediction models, find possible weather conditions related to changes, determine the intensity of the disease, establish management measures to reduce the possible effect of the incidence and severity on the field, or to speed up the disease with diagnosis purposes. The development of characteristic symptoms of viroids in economically important plants using *in vitro* culture has proven to be an effective tool in transmission-related studies (El-Dougdoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012) and diagnosis by indexing (Kapari *et al.*, 2008). Alternative techniques to the official diagnosis by indexing that help understand the behavior of

el desarrollo de una enfermedad permiten generar modelos de predicción, detectar posibles variables climáticas asociadas con cambios, determinar la intensidad de la enfermedad, establecer medidas de manejo para reducir el posible efecto de la incidencia y severidad en campo o acelerar la velocidad de la enfermedad con fines de diagnóstico. El desarrollo de síntomas característicos de viroides en plantas de interés económico mediante el uso de cultivo *in vitro* ha mostrado ser una herramienta eficaz en estudios relacionados con transmisión (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černí *et al.*, 2012) y diagnóstico por indexado (Kappari *et al.*, 2008). Técnicas alternativas al diagnóstico oficial por indexado que permitan conocer el comportamiento de los viroides en ambientes controlados pueden ser útiles en el desarrollo de diagnósticos oportunos, la prevención de la enfermedad y el establecimiento de medidas de manejo. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue caracterizar al CEVd en condiciones de indexado *in vitro* e *in vivo* comparando la eficiencia de transmisión y el tiempo necesario para el desarrollo de síntomas causados por el viroide para establecer su aplicabilidad en el diagnóstico biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de callos y brotes

Varetas de 8 cm longitud y 3 mm de diámetro de citron etrog (*C. medica*) se disectaron de plantas sanas e infectadas con CEVd aislamiento E811 cultivadas en invernadero. El material vegetal infectado con CEVd fue obtenido de la colección de la DGSV-SENASICA en México procedente de USDA-ARS. Las varetas se lavaron con jabón líquido y agua corriente, se desinfestaron con 0.5 % de hipoclorito de sodio durante un minuto,

viroids in controlled environments can help develop timely diagnoses, prevent diseases, and establish management measures. Based on this, the aim of this work was to characterize CEVd under indexing conditions *in vitro* and *in vivo* comparing the efficiency of transmission and the time required to develop symptoms caused by the viroid to establish its applicability in the biological diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

Cultures of callus and sprouts

Citron (*C. medica*) budwood, 8 cm long and 3 mm in diameter, were dissected from plants, both healthy and diseased with CEVd isolate E811 planted in greenhouses. The plant material infected with CEVd was obtained from the collection of the DGSV-SENASICA in Mexico, from the USDA-ARS. The budwood were washed with liquid soap and faucet water, disinfested with 0.5% sodium hypochlorite solution for one minute, 70% ethanol for 50 seconds, and finally rinsed three times with sterile distilled water in aseptic conditions inside a laminar flow cabinet. The budwood were divided into 3 cm long segments, dissected longitudinally, and cultured *in vitro* with the cut surface in contact with the medium. The explants were cultured in each jar, 8 cm in diameter and 12 cm tall. The callus induction medium contained inorganic Murashige and Skoog salts (1962) supplemented with i-inositol (100 mg L⁻¹), thiamine HCl (0.1 mg L⁻¹), pyridoxine HCl (0.5 mg L⁻¹), nicotinic acid (0.5 mg L⁻¹), sucrose (30 g L⁻¹), naphthaleneacetic acid (10 mg L⁻¹) and 6-benzylaminopurine (0.25 mg L⁻¹) according to the procedure by Duran *et al.* (1989) and Navas *et al.* (1995). The medium was adjusted to a pH of 5.7, solidified with 2.8 g L⁻¹ of phytagel® Sigma and sterilized in an autoclave

70 % de etanol durante 50 segundos y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril en condiciones asépticas dentro de una campana de flujo laminar. Las varetas se dividieron en segmentos de 3 cm de largo, se disectaron longitudinalmente y se cultivaron *in vitro* con la superficie cortada en contacto con el medio. Los explantes se cultivaron en cada frasco de 8 cm de diámetro por 12 cm de alto. El medio para inducción de callo contenía sales inorgánicas de Murashige and Skoog (1962) suplementado con i-inositol (100 mg L^{-1}), tiamina HCl (0.1 mg L^{-1}), piridoxina HCl (0.5 mg L^{-1}), ácido nicotínico (0.5 mg L^{-1}), sacarosa (30 g L^{-1}), ácido naftalenácetico (10 mg L^{-1}) y 6-benzilaminopurina (0.25 mg L^{-1}) de acuerdo con el procedimiento de Duran *et al.* (1989) y Navas *et al.* (1995). El medio se ajustó a pH de 5.7, se solidificó con 2.8 g L^{-1} de phytigel® Sigma y se esterilizó en autoclave a 116°C por 20 minutos. Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 semanas hasta la formación de callo y se seleccionaron aquellos que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias. Pequeñas porciones de callo de 3 mm se utilizaron para el indexado *in vitro* una vez que se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR.

Se obtuvieron tallos con brotes de 4 a 5 cm de largo de plantas de citron etrog cultivadas en invernadero sin historial de infección y negativas a CEVd por RT-PCR. Los tallos con brotes se lavaron y desinfestaron superficialmente con el procedimiento descrito anteriormente y se sumergieron durante 1 minuto en solución de estreptomycin (200 mg L^{-1}) para eliminar bacterias del tejido. Los brotes se disectaron para cortar secciones de tallo de $1.5 \pm 0.5 \text{ cm}$ de las plantas y se cultivaron en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) adicionando 30 g L^{-1} de sacarosa. El medio se ajustó a pH de 5.7 y se dispuso 25 ml en tubos de ensayo y se esterilizó en autoclave a 116°C por 20 minutos.

at 116°C for 20 minutes. The cultivars were kept in the dark at $26^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ for 3 weeks until the callus was formed, those without contamination by saprophytic fungi or bacteria, were chosen. Small 3 mm portions of callus were used for the indexing *in vitro* once the presence of CEVd was found using RT-PCR.

Citron plant stalks were obtained with sprouts 4 to 5 cm in length, planted in a greenhouse, with no record of infections and negative for CEVd by RT-PCR. The stalks with sprouts were washed and superficially disinfested using the procedure described previously, and submerged in water for 1 minute in a streptomycin solution (200 mg L^{-1}) to eliminate bacterial from the tissue. The sprouts were dissected to cut stalk sections of $1.5 \pm 0.5 \text{ cm}$ long from the plants and those were cultured in a MS medium (Murashige and Skoog, 1962), adding 30 g L^{-1} of sucrose. The medium pH was adjusted to 5.7 and dispensed in 25 ml in test tubes and sterilized in an autoclave at 116°C for 20 minutes. The medium was solidified with 3.0 g L^{-1} of phytigel® (Sigma). The sprouts were incubated at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 12 hours and after 48 hours of incubation, the sprouts without contamination by saprophytic fungi or bacteria were selected to indexing.

Indexing *in vitro*

The sprouts were inoculated by a lateral cutting, 2-3 mm long, tongue-shaped graft with callus. The inoculated sprouts were transferred to new culture tubes solid sterile MS medium, and were incubated for 50 days at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 16 hours. The blades used during inoculation were disinfested between treatments by immersion in a 1 % sodium hypochlorite solution for 15 seconds to prevent cross-infections (Kovalskaya and Hammond, 2014). During the test, the number

tos. El medio se solidificó con 3.0 g L⁻¹ de phytagel® (Sigma). Los brotes se incubaron a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 12 horas luz y después de 48 horas de incubación los brotes que no presentaron contaminación por hongos saprófitos o bacterias se seleccionaron para indexar.

Indexado *in vitro*

Los brotes se inocularon por injerto lateral en forma de lengüeta de 2-3 mm de largo con callo. Los brotes inoculados fueron transferidos a tubos nuevos de cultivo que contenían medio MS sólido estéril y se incubaron durante 50 días a 25 ± 2 °C con fotoperiodo de 16 horas. Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre tratamientos por inmersión en solución con 1 % de hipoclorito de sodio durante 15 segundos para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Durante el ensayo se registró el número de brotes con síntomas y se midió la altura directamente sobre el brote con un vernier digital en la campana de flujo laminar. La presencia de CEVd en los brotes se detectó por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).

Indexado *in vivo*

Plantas indicadoras de citroverduz con diagnóstico negativo a CEVd por RT-PCR se inocularon con injertos de yema y como testigo se usaron plantas no injertadas. Las yemas injertadas provenían de plantas que se diagnosticaron previamente como libres o infectadas con CEVd. Durante el establecimiento del ensayo, las plantas se podaron a 30 cm de altura y todas las hojas se eliminaron al momento de injertar para permitir el desarrollo de nuevos brotes. El injerto de yema se realizó de acuerdo con el método de Roistacher (1991). Las navajas utilizadas durante la inoculación se desinfectaron entre

of sprouts with symptoms were recorded, and the height above the sprout was measured using a digital caliper in the laminar flow cabinet. The presence of CEVd in the sprouts was detected by the chain reaction of polymerase with reverse transcriptase (RT-PCR).

Indexing *in vivo*

Citron indicator plants with negative CEVd diagnoses by RT-PCR were inoculated with bud grafts and non-grafted plants were used as a control. The grafted buds came from plants previously diagnosed as healthy or infected with CEVd. During the setup of the test, the plants were trimmed to a height of 30 cm and all their leaves were eliminated for grafting to help new sprouts develop. The bud graft was carried out following the method by Roistacher (1991). The blades used during inoculation were disinfested between treatments and repetitions by submerging them in a 1 % sodium hypochlorite solution for one minute to prevent cross-infections (Kovalskaya and Hammond, 2014). The plants were planted individually in 4L plastic pots and kept in a greenhouse at 28-32 °C. For one year and four months, a record was kept of symptoms described by Roistacher (1991) and Bernard *et al.* (2009), the presence of CEVd was detected using RT-PCR and the height was measured from ground level to the tallest sprout.

Detection of CEVd by RT-PCR

The citron budwood used as a source of plant material for the culture of callus and sprouts were diagnosed for the presence or absence of CEVd one week before placing the material. Indexed sprouts were diagnosed 60 days after inoculation and citron plants of the *in vivo* indexing were

tratamientos y repeticiones por inmersión en una solución con 1 % de hipoclorito de sodio durante un minuto para prevenir infecciones cruzadas (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las plantas fueron cultivadas de forma individual en macetas de plástico de 4 L y mantenidas en invernadero con 28-32 °C. Durante año y cuatro meses se registró el desarrollo de síntomas descritos por Roistacher (1991) y Bernard *et al.* (2009), se detectó la presencia de CEVd por RT-PCR y se midió la altura del nivel del suelo hasta el brote más alto.

Detección de CEVd por RT-PCR

Las varetas de citron que sirvieron como fuente de material vegetal para el cultivo de callos y brotes fueron diagnosticadas a la presencia o ausencia de CEVd una semana antes de colectar el material. Los brotes indexados se diagnosticaron a los 60 días después de la inoculación y las plantas de citron del indexado *in vivo* se diagnosticaron una semana antes y 180 días después de injertar. La presencia de CEVd en callos, yemas, brotes indexados cultivados *in vitro* y en plantas indexadas en invernadero se confirmó por RT-PCR. El RNA total se extrajo con los reactivos y el protocolo de RNeasy Plant Mini® de Qiagen y la síntesis de cDNA se llevó a cabo con la enzima SuperScrip™ II Reversa Transcriptasa (Invitrogen Corp.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La amplificación del cDNA viroidal por PCR se llevó a cabo con los iniciadores CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' y CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' que amplifican un fragmento de 371 pb (Yang *et al.*, 1992) de acuerdo con las condiciones de Bernad *et al.* (2009) usando y Platinum® *Taq* polimerase high fidelity (Invitrogen Corp.). Los productos de la reacción fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2 % teñido con bromuro de etidio (0.5 µg ml⁻¹), visualizado en luz

diagnosed one week before and 180 days after grafting. The presence of CEVd in callus, buds, sprouts indexed *in vitro* and in a greenhouse was confirmed by RT-PCR. Total RNA was extracted with the reagents and the protocol by RNeasy Plant Mini® by Qiagen and the cDNA synthesis was carried out with the enzyme SuperScrip™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp.) following manufacturer instructions. The amplification of viroidal cDNA by PCR was carried out in primers CEVd1 5'-CCC TGA AGG ACT TCT TCC CC-3' and CEVd2 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGG AA -3' that amplify a fragment of 371 pb (Yang *et al.*, 1992) according to conditions described by Bernad *et al.* (2009) using Platinum® *Taq* polymerase high fidelity (Invitrogen Corp.). The products of the reaction were analyzed by electrophoresis in a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 µg ml⁻¹), visualized under UV light and photodocumented in a Gel Doc EZ system® (Biorad). The fragments obtained in the RT-PCR were sequenced in an Applied Biosystem Corp Genetic Analyzer 3100. The sequences were analyzed using the program Chromas V. 2.5.0, aligned with Clustal W in the program Mega v.7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016), and a consensual sequence was obtained using the program Seaview v.4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). The consensual sequence was compared with the original isolation sequence and with sequences deposited in the National center for biotechnology information (NCBI, 2010) through the option BLASTn ver 2.3.0 (Altschul *et al.*, 1990).

Sensitivity, specificity, and accuracy of the RT-PCR: The parameters related to the diagnosis by RT-PCR were calculated for the treatments grafted with tissue infected with CEVd in each indexing procedure according to Papayiannis, 2014. The calculation formulas were as follows: sensitivity=

UV y fotodocumentado en un equipo Gel Doc EZ system® (Biorad). Los fragmentos obtenidos de la RT-PCR fueron secuenciados en un equipo Genetic Analyzer 3100 de Applied Biosystem Corp. Las secuencias se editaron con el programa Chromas V. 2.5.0, se alinearon con Clustal W en el programa Mega v.7.0.14 (Kumar *et al.*, 2016) y se obtuvo una secuencia consenso con el programa Seaview v.4.5.4 (Gouy *et al.*, 2010). La secuencia consenso se comparó con la secuencia del aislamiento de origen y con secuencias depositadas en el National center for biotechnology information (NCBI, 2010) a través de la opción BLASTn ver 2.3.0 (Altschul *et al.*, 1990).

Sensibilidad, especificidad y exactitud de la RT-PCR: Los parámetros asociados al diagnóstico por RT-PCR se calcularon para los tratamientos injertados con tejido infectado por CEVd en cada procedimiento de indexado de acuerdo con Papa-yanis, 2014. Las fórmulas de cálculo fueron: sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)* 100; especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)* 100; exactitud= (muestras negativas+ positivos/ negativos+ positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)* 100.

Eficiencia del indexado: La eficiencia del indexado (Θ) se determinó como la probabilidad de expresión de síntomas (P) en muestras inoculadas con tejido infectado (n) con un nivel de confianza del 95 %, de acuerdo a la metodología de Vidalakis *et al.* (2004). La eficiencia se calculó con la fórmula $\Theta = 1 - (1 - P_L)^n$ usando el límite inferior de probabilidad de Clopper y Pearson ($P_L = 0.7935$ calculado para 16 unidades) y $n=4$ como el número mínimo de muestras recomendado por Roistacher (1991) y Vidalakis *et al.* (2004) para el diagnóstico de CEVd por indexado.

(positive samples / positive samples+ false negatives)* 100; specificity= (negative samples / negative samples + false positives)* 100; accuracy= (negative samples + positives/ negatives+ positives+ false negatives+ false positives)* 100.

Indexing efficiency: The indexing efficiency (Θ) was determined as the probability of the expression of symptoms (P) in samples inoculated with infected tissue (n) with a level of confidence of 95 %, according to the methodology by Vidalakis *et al.* (2004). Efficiency was calculated with the formula $\Theta = 1 - (1 - P_L)^n$ using the lower probability limit by Clopper and Pearson ($P_L = 0.7935$ calculated for 16 units) and $n=4$ as the minimum number of samples recommended by Roistacher (1991) and Vidalakis *et al.* (2004) for the diagnosis of CEVd by indexing.

Experimental design and statistical analysis: We used an experimental design of fields divided in time by each indexing condition (*in vitro* and *in vivo*). The largest field was for the treatments, and the small field, the days after inoculation (dai). The biological indexing *in vitro* of CEVd was composed of four experiments, separated in time, which included three treatments with four repetitions: the inoculation of sprouts with callus infected by CEVd (T1), inoculation with a healthy callus (T2) and a non-inoculated sprout as a control (Ta) with a total of 48 samples analyzed. The variables evaluated were the incidence of sprouts with symptoms at 10, 15 y 20 dai and accumulated height from the initial height at 10, 20, 30 and 40 dai.

The *in vivo* biological indexing consisted in evaluating four experiments with three treatments: plant inoculated with buds infected by CEVd (T3), plant inoculated with buds without evidence of infection by CEVd by RT-PCR and indexing (T4) and non-inoculated plant as controls (Tb) with a

Diseño experimental y análisis estadístico: Se utilizó un diseño experimental de parcelas divididas en el tiempo por cada condición de indexado (*in vitro* e *in vivo*). La parcela grande fueron los tratamientos y la parcela chica el tiempo transcurrido en días después de la inoculación (ddi). El indexado biológico *in vitro* de CEVd se conformó de cuatro experimentos separados en tiempo que incluyeron tres tratamientos con cuatro repeticiones: la inoculación de brote con callo infectado por CEVd (T1), la inoculación con callo sano (T2) y brote sin inocular como testigo (Ta) con un total de 48 muestras analizadas. Las variables que se evaluaron fueron incidencia de brotes con síntomas a los 10, 15 y 20 ddi y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30 y 40 ddi.

El indexado biológico *in vivo* consistió en evaluar cuatro experimentos con tres tratamientos: planta inoculada con yemas infectadas por CEVd (T3), planta inoculada con yemas sin evidencia de infección por CEVd por RT-PCR e indexado (T4) y planta no inoculada como testigos (Tb) con un total de 48 muestras analizadas y cuatro repeticiones por tratamiento. Las variables que se evaluaron fueron incidencia a los 40, 50 y 60 días después de la inoculación (ddi) y altura acumulada a partir de la altura inicial a los 10, 20, 30, 40 y 180 ddi. Los datos de las variables se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de confianza del 95 % con el paquete estadístico Statistical Analysis System ver 9.0 (2002). Se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad en brotes y plantas infectados con el método del trapecio en el programa ABCDPE ver 1.1 (Mora y Acevedo, 2016).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección por RT-PCR: Las muestras infectadas de ambos indexados resultaron positivas a CEVd

total of 48 samples analyzed and four repetitions per treatment. The variables evaluated were the incidence at 40, 50, and 60 days after inoculation (dai) and accumulated height from the initial height at 10, 20, 30, 40, and 180 dai. The data of the variables underwent an analysis of variance and Tukey comparison of averages test, with a trust level of 95 % using the Statistical Analysis System ver 9.0 (2002). The area under the disease progress curve was calculated for infected sprouts and plants using the trapeze method in the AUDPC program ver 1.1 (Mora and Acevedo, 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

Detection by RT-PCR: The infected samples of both indexing turned out positive for CEVd with 94 to 100 % sensitivity in RT-PCR (Table 1). The sprouts grafted with healthy callus, plants grafted with healthy buds, and the controls, turned out negative (Figure 1). The detection of CEVd in the samples of the *in vitro* indexing of this study correspond with the results obtained by Hajeri *et al.* (2011), who detected the presence of CEVd in plantlets developed *in vitro*, inoculated with protoplasts of infected callus. To avoid the sensitivity, specificity, and accuracy in this work, we considered as false negatives the samples that showed CEVd symptoms, but which were not amplified by RT-PCR, which could have been due to the presence of inhibitors in the reaction or to the use of a hardly thermostable reverse transcriptase; these deficiencies can be overcome with more sensitive protocols (Guerrero *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) that allow for an increase in the temperature of cDNA synthesis of the viroid and reduce the formation of secondary structures of the RNA of interest. The specificity and accuracy of the indexing was 97 to 100 %, values that indicate the health status of the samples. The results of the

con 94 a 100 % de sensibilidad en la RT-PCR (Cuadro 1). Los brotes injertados con callo sano, plantas injertadas con yema sana y los testigos resultaron negativos (Figura 1). La detección de CEVd en las muestras del indexado *in vitro* de este estudio concuerdan con los resultados obtenidos por Hajeri *et al.* (2011) quienes lograron detectar la presencia de CEVd en plántulas desarrolladas *in vitro* inoculadas con protoplastos de callos infectados. Para evaluar la sensibilidad, especificidad y exactitud en este trabajo, se consideró como falsos negativos a muestras que presentaron síntomas de CEVd pero que no amplificaron por RT-PCR lo cual pudo deberse a la presencia de inhibidores en la reacción o al uso de una transcriptasa reversa poco termoes estable, estas deficiencias pueden ser superadas con protocolos más sensibles (Guerrero *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que permitan incrementar la temperatura de síntesis de cDNA del viroide y disminuir la formación de estructuras secundarias del ARN de interés. La especificidad y exactitud en los indexados fue del 97 a 100 %, valores que nos indican el estado fitosanitario de las muestras. Los resultados de la secuenciación mostraron que los fragmentos obtenidos correspondían al *Citrus exocortis viroid* con 99 % de similitud y 99 % de cobertura con un tamaño de 310 pb indicando su presencia en las plantas indicadoras. Probablemente el alto valor de similitud encontrado se deba a que la composición genética del viroide suele no variar cuando es inoculado en el mismo tipo de hospedero de donde se aisló originalmente y a que los viroides se componen de haplotipos estrechamente relacionados (Bernard *et al.*, 2009). La detección de viroides en cítricos por RT-PCR es una herramienta útil (Saponari *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) que no representa una desventaja al diagnóstico biológico ya que las aportaciones del indexado están relacionadas con el estudio de la interacción planta patógeno en un ambiente controlado de desarrollo

Cuadro 1. Sensibilidad, especificidad, exactitud y eficiencia asociados al diagnóstico de CEVd por RT-PCR e indexado.

Table 1. Sensitivity, specificity, accuracy, and efficiency related to the diagnosis of CEVd using RT-PCR and indexing.

Diagnóstico por RT-PCR	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Positivos	15	16
Falsos positivos	0	0
Negativos	16	16
*Falsos negativos	1	0
Sensibilidad	93.8 %	100 %
Especificidad	100 %	100 %
Exactitud	96.9 %	100 %
Diagnóstico por indexado	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
Muestras con síntomas/ muestras injertadas	16/16	16/16
Eficiencia del indexado (Θ) usando 4 unidades como indicador	99.8 %	99.8 %

Sensibilidad= (muestras positivas/ muestras positivas+ falsos negativos)* 100; Especificidad= (muestras negativas/ muestras negativas+ falsos positivos)* 100; Exactitud= (muestras negativas + positivos / negativos + positivos+ falsos negativos+ falsos positivos)* 100; Eficiencia (Θ)= $1 - (1 - P_L)^n$; con probabilidad de Clopper y Pearson $P_L = 0.7935$ y $n = 4$. *Para fines comparativos en éste trabajo se consideró como falso negativo la ausencia de amplificación por RT-PCR en muestras con síntomas / Sensitivity= (positive samples / positive samples + false negatives)* 100; Specificity= (negative samples / negative samples + false positives)* 100; Accuracy= (negative samples + positives / negatives + positives+ false negatives + false positives)* 100; Efficiency (Θ)= $1 - (1 - P_L)^n$; with Clopper and Pearson probability $P_L = 0.7935$ and $n = 4$. *For comparative purposes, this work considered a false negative the absence of amplification by RT-PCR in plants with symptoms.

sequencing showed that the fragments obtained corresponded to the *Citrus exocortis viroid* with a similarity of 99% and 99% coverage with a size of 310 pb, indicating its presence in indicator plants. The high similarity value found may be due to the genetic composition of the viroid not usually varying when it is inoculated in the same type of host from which it was originally isolated, and to the fact that viroids are composed of broadly related haplotypes

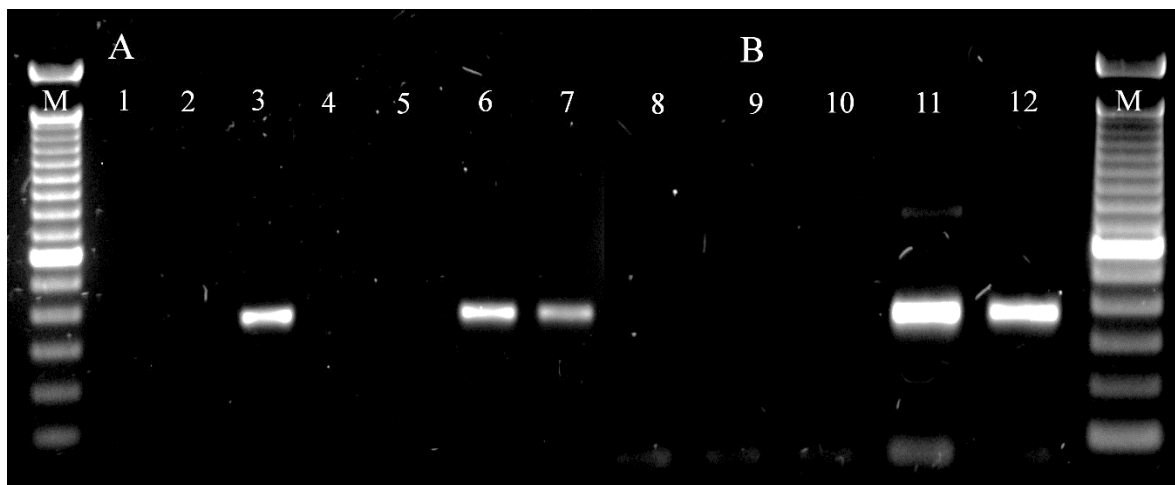


Figura 1. Detección de *Citrus exocortis viroid* por RT-PCR. (A) Carriles 1-7: Indexado *in vitro*, M: marcador de 100 pb Invitrogen®, 1: control negativo sin ADN molde, 2: callo sano, 3: callo infectado, 4: brotes no injertados, 5: brotes injertados con callo sano, 6: brotes injertados con callo infectado 7: control positivo de tejido infectado. (B) Carriles 8-12: Indexado *in vivo*, 8: control negativo sin ADN molde, 9: plantas no injertadas, 10: plantas injertadas con yema sana, 11: plantas injertadas con yema infectada, 12: control positivo de CEVd. El fragmento amplificado corresponde a 371 pb. La imagen es representativa de un total de 48 muestras analizadas *in vitro* y 48 muestras *in vivo*.

Figure 1. Detection of *Citrus exocortis viroid* by RT-PCR. (A) Lanes 1-7: Indexing *in vitro*, M: 100 pb Invitrogen®, 1: negative control without mold DNA, 2: healthy callus, 3: infected callus, 4: non-grafted sprouts, 5: sprouts grafted with healthy callus, 6: sprouts grafted with infected callus 7: positive infected tissue control. (B) Lanes 8-12: Indexing *in vivo*, 8: negative control without mold DNA, 9: non-grafted plants, 10: plants grafted with healthy bud, 11: plants grafted with infected bud, 12: positive CEVd control. The amplified segment corresponds to 371 pb. The image is representative of a total of a total of 48 samples analyzed *in vitro* and 48 samples *in vivo*.

de la enfermedad. En infecciones asintomáticas en que no hay evidencia visual de la infección por viroides en el hospedante (Kovalskaya y Hammond, 2014) la detección por RT-PCR puede contribuir a determinar la presencia y constitución genética de CEVd y un ensayo de indexado que incluya diferentes hospedantes puede determinar cuáles son potencialmente susceptibles y el grado de daño que puede llegar a causar una enfermedad.

Altura, incidencia y ABCP

Se presentaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) entre tratamientos, tiempo (ddi) y la interacción tratamiento* tiempo para las variables evaluadas en ambos procedimientos de indexado

(Bernard *et al.*, 2009). The detection of viroids in citrus by RT-PCR is a useful tool (Saponari *et al.*, 2013; Papayiannis, 2014) which does not represent a disadvantage to the biological diagnosis, since the contributions of the indexing are related to the study of the plant-pathogen interaction in a controlled environment for the development of the disease. In asymptomatic infections in which there is no visual evidence of an infection by viroids in the host (Kovalskaya and Hammond, 2014) detection by RT-PCR can contribute to determine the presence and genetic constitution of CEVd and an indexing test that includes different hosts could help determine which ones are potentially susceptible and the degree of damage a disease can cause.

(Cuadro 2). La altura media acumulada de los tratamientos *in vitro* fue 35.8 mm en testigo; 32.1 mm en brotes injertados con callos sanos y 19.3 mm en brotes injertados con callos infectados; mientras que para indexado en invernadero fueron 156.5 mm para testigo, 162.9 mm para plantas injertadas con yema sin infección y 106.7 mm para plantas injertadas con yemas infectadas. Existieron diferencias significativas en las alturas de los brotes *in vitro* en todas las fechas de evaluación. En las plantas indexadas en invernadero se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) a los 10 días después de la inoculación y altamente significativas a los 180 días. Se observó incremento de altura más o menos constante a través del tiempo en los tratamientos inoculados con callo o yema sana con respecto al testigo mientras que la altura de los tratamientos infectados fue 46 % menor (Figura 2A-B). Las diferencias en la altura de los brotes inoculados y los testigos del indexado *in vitro* observados en este estudio son parecidos a los resultados obtenidos por Černí *et al.* (2012) quienes compararon la altura de brotes de *Gynura aurantiaca* infectados por CEVd cultivados *in vitro* con valores estadísticos de altura mayores en los brotes sanos. En el indexado *in vivo* la altura de plantas injertadas con yemas infectadas

Height, incidence, and ABCP

Highly significant differences ($p \leq 0.01$) were observed between treatments, time (dai) and the interaction treatment* time for the variables evaluated in both indexing procedures (Table 2). The average accumulated height of the treatments *in vitro* was 35.8 mm for the control; 32.1 mm for sprouts grafted with healthy callus and 19.3 mm for sprouts grafted with infected callus; whereas for indexing in the winter, these were 156.5 mm for the control, 162.9 mm for plants grafted with uninfected buds, and 106.7 mm for plants grafted with infected buds. Significant differences were observed in the heights of the sprouts *in vitro* in all the evaluation dates. In plants indexed in greenhouses, significant differences ($p \leq 0.05$) were found 10 days after inoculation, and highly significant after 180 days. A roughly consistent increase in height was observed in time in the treatments inoculated with healthy callus or buds with respect to the control, while the height of the infected treatments was 46 % lower (Figure 2A-B). The differences in height of the inoculated sprouts and the controls of the *in vitro* indexing observed in this study are similar to results obtained by Černí

Cuadro 2. Cuadrados medios de la altura e incidencia acumulada en dos condiciones de indexado.

Table 2. Average squares of the height and accumulated incidence in two indexing conditions.

FV	GL		<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Altura	Incidencia	Altura	Incidencia	Altura	Incidencia
Trat	2	2	1197.5**	2.6**	14226.0**	2.0**
Tiempo	3	2	2427.3**	0.07**	706280.8**	0.17**
Trat*tiempo	6	4	132.5**	0.07**	12007.1**	0.17**
Media			29.1	0.27	142.0	0.24
CV (%)			1.9	19.8	9.0	7.6

FV: factor de variación, GL: grados de libertad, Trat: tratamiento, CV: coeficiente de variación, **: altamente significativo ($p \leq 0.01$) / FV: factor of variation, GL: degrees of freedom, Trat: treatment, CV: coefficient of variation, **: highly significant ($p \leq 0.01$).

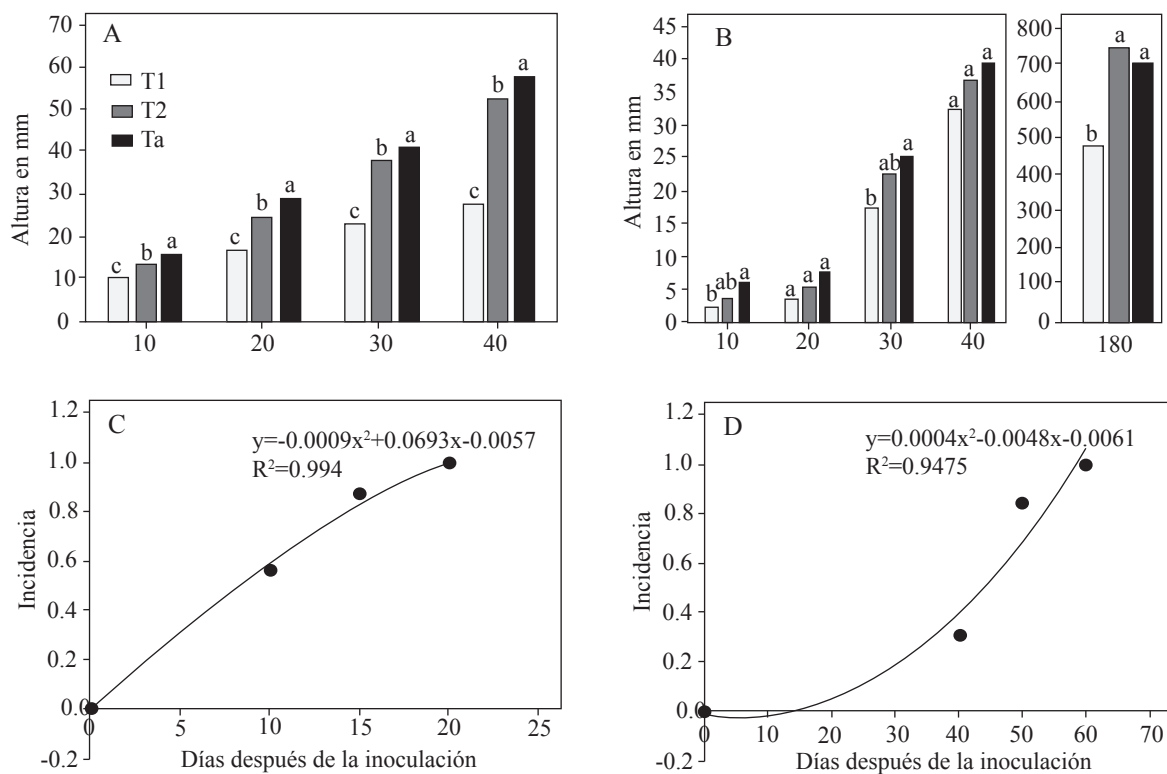


Figura 2. Comparación de medias de altura y curva de incidencia en brotes cultivados *in vitro* (A, C) y plantas injertadas *in vivo* (B, D). Letras distintas en las columnas son estadísticamente diferentes con Tukey ($p=0.01$). T1: brotes injertados con callo infectado, T2: brotes injertados con callo sano, Ta: brotes no injertados, T3: plantas injertadas con yema infectada, T4: plantas injertadas con yema sana, Tb: plantas no injertadas. La línea y el modelo (C, D) representan el ajuste mediante una regresión cuadrática.

Figure 2. Comparison of averages of height and incidence curve in sprouts planted *in vitro* (A, C) and plants grafted *in vivo* (B, D). Different letters in each column are statistically different with Tukey ($p=0.01$). T1: sprouts grafted with infected callus, T2: sprouts grafted with healthy callus, Ta: non-grafted sprouts, T3: plants grafted with infected bud, T4: plants grafted with healthy bud, Tb: non-grafted plants. The line and model (C, D) represent the adjustment with a quadratic regression.

fue 42 % menor con respecto al testigo, síntoma que se asocia a la infección de CEVd en plantas de cítricos (Kovalskaya y Hammond, 2014). Las diferencias en altura entre tratamientos parecen estar relacionadas con la expresión diferencial de auxinas y citoquininas incluyendo la función de los meristemas apicales y laterales, los procesos de inmunidad de las plantas y la respuesta al estrés biótico o abiótico (Argueso *et al.*, 2010; Naseem y Dandekar, 2012) como el causado por una infección con CEVd. Probablemente el contenido de auxinas promovió la dominancia apical en los

et al. (2012), who compared the heights of *Gynura aurantiaca* sprouts infected by CEVd planted *in vitro* with greater statistical values for height in healthy sprouts. In the *in vivo* indexing, the height of plants grafted with infected buds was 42% lower than the control, symptom related to the infection with CEVd in citrus plants (Kovalskaya and Hammond, 2014). The height differences between treatments seem to be related to the differential expression of auxins and cytokinins, including the function of apical and lateral meristems, the plant immunity processes and the response to biotic and

brotos y plantas sanas de éste trabajo resultando en mayor altura, mientras que altos contenidos de citoquininas en plantas y brotes infectados por CEVd pudieron inhibirla (Laplaze *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Naseem y Dandekar, 2012) debido al impacto de las citoquininas en el flujo, distribución y señalización de la auxina (Shimizu *et al.*, 2009).

La incidencia en los brotes cultivados *in vitro* se incrementó a través del tiempo alcanzando la tasa más alta 20 ddi por injerto comparado con la curva de progreso de la enfermedad *in vivo* (Figura 2C-D) donde se alcanzó la máxima tasa el día 60 después de injertar. El indexado *in vitro* disminuyó 75 % el tiempo requerido para la aparición de síntomas típicos de la enfermedad después de la inoculación comparado con los ensayos del indexado *in vivo*, los cuales requirieron 30 días más. Una evaluación detallada del tiempo necesario para llevar a cabo un indexado podría incluir el tiempo de formación de callos *in vitro* (3 semanas). En este estudio solamente se consideró la variable ddi como el momento a partir del cual patógeno y hospedante están en contacto para la expresión de síntomas. Es cierto que el indexado *in vitro* requiere de tiempo para el desarrollo de los callos que servirán como inóculo, pero existe la posibilidad de utilizar otro tipo de tejido como la corteza de plantas infectadas (Kapari *et al.*, 2008). Además, la presencia de CEVd en brotes y callos cultivados *in vitro* podría contribuir a desarrollar nuevas líneas de investigación de aspectos relacionados con la patogenicidad de los viroides ya que el cultivo de callo infectado es fácil de conservar y multiplicar y es un tejido útil cuando se requiere homogenizar la muestra. Trabajos futuros que contribuyan a determinar si callos infectados con CEVd pueden infectar plantas cultivadas en invernadero serían de utilidad en el indexado tradicional *in vivo*.

El progreso de la enfermedad se ajustó a un modelo de regresión cuadrática donde $y = -0.0009x^2 +$

abiotic stresses (Argueso *et al.*, 2010; Naseem and Dandekar, 2012) such as the one cause by an infection with CEVd. The auxin content may have promoted the apical dominance in healthy sprouts and plants in this work, resulting in a greater height, while the high contents of cytokinins in plants and sprouts infected by CEVd could have inhibited it (Laplaze *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2009; Naseem and Dandekar, 2012) due to the impact of the cytokinins on the flow, distribution, and signaling of the auxin (Shimizu *et al.*, 2009).

The incidence on the sprouts planted *in vitro* increased with time, reaching the highest rate 20 dai by grafting, in comparison with the progress curve of the disease *in vivo* (Figure 2C-D), where the highest rate was reached on day 60 after grafting. The *in vitro* indexing decreased 75 % in the time required for the appearance of typical symptoms of the disease after inoculation compared with the tests of the indexing *in vivo*, which required another 30 days. A detailed evaluation of the time needed to carry out an indexing could include the time of formation of callus *in vitro* (3 weeks). This study only considered the variable dai as the moment as of which pathogen and host are in contact for the expression of symptoms. Although it is true that indexing *in vitro* requires time to develop callus that will act as inoculants, it is possible to use another type of tissue such as the cortex of infected plants (Kapari *et al.*, 2008). Also, the presence of CEVd in sprouts and callus planted *in vitro* could contribute to develop new lines of research of aspects related to the pathogenicity of the viroids, since infected callus cultures are easy to preserve and multiply, and it is a useful tissue when the sample needs to be homogenized. Future investigations that contribute to determine if callus infected with CEVd can infect plants grown in greenhouses could be useful in traditional *in vivo* indexing.

$0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.994$ con $p \leq 0.05$ y ABCP = 10.781 para el indexado *in vitro*, mientras que para el indexado *in vivo* fueron $y = 0.0004x^2 + 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.947$ no significativa, y el ABCP = 9.844. El método del área bajo la curva del progreso de la enfermedad permitió una mejor comparación de los ambientes en que se desarrolló el viroide con respecto al modelo de regresión cuadrático que resultó no significativo en el indexado *in vivo* debido a la forma irregular de los datos con respecto al tiempo. La incidencia inicial mayor *in vitro* durante la aparición de la enfermedad representó una menor tolerancia al desarrollo de síntomas de CEVd comparado con la incidencia inicial *in vivo*. El uso de la misma variedad indicadora en ambos indexados indica que la concentración y el tamaño del hospedante entre un indexado y otro (5-30 cm) pudieron ser los principales factores de influencia en el desarrollo de la enfermedad. La rapidez con la que aparecen los síntomas *in vitro* podría deberse al tiempo que requieren los viroides para replicarse y moverse dentro de la planta inoculada (Kapari *et al.*, 2008). Posiblemente una mayor concentración derivada del tamaño de los brotes (5 cm) con respecto al tamaño de las plantas (30 cm) favoreció el rápido desarrollo de síntomas *in vitro* en éste estudio. Se ha demostrado que las temperaturas (24-40 °C) a las que se desarrollan los bioensayos contribuye a incrementar la concentración del viroide para la expresión de síntomas de CEVd (Škorić *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2015) potenciándose en hospederos más pequeños. Otro factor implicado en el proceso de infección por viroides es el movimiento a larga distancia dentro del floema que permite alcanzar hojas, raíces y órganos lejos de los tejidos inicialmente infectados (Bani *et al.*, 2010). En éste trabajo, la distancia de movimiento de CEVd en plantas con raíces del indexado *in vivo* fue mayor comparada con los brotes cultivados *in vitro* retardando el proceso de infección y en consecuencia la expresión de síntomas.

The disease progress was adjusted to a quadratic regression model, where $y = -0.0009x^2 + 0.0693x - 0.0057$, $R^2 = 0.994$ with $p \leq 0.05$ and AUDPC = 10.781 for the indexing *in vitro*, while for the indexing *in vivo* they were $y = 0.0004x^2 + 0.0048x - 0.0061$, $R^2 = 0.947$ not significant, and the AUDPC = 9.844. The Area under the disease progress curve method helped obtain a better comparison of the environments in which the viroid developed in regard to the quadratic regression method that did not result significant in the *in vivo* indexing, due to the irregular shape of the data in regard to time. The highest initial incidence *in vitro* during the appearance of the disease represented a lower tolerance to the development of the CEVd symptoms in comparison with the initial incidence *in vivo*. The use of the same indicator variety in both indexing indicates that the concentration and the size of the host between indexing (5-30 cm) could be the main factors that influence the development of the disease. The speed with which the symptoms appear *in vitro* could be due to the time required by the viroids to replicate and move in the inoculated plant (Kapari *et al.*, 2008). Possibly, a higher concentration derived from the size of the sprouts (5 cm) in regard to the size of the plants (30 cm) favored the quick development of symptoms *in vitro* in this study. It has been proven that the temperatures (24-40 °C) the biotests undergo contributes to increasing the concentration of the viroid for the expression of symptoms of CEVd (Škorić *et al.*, 2001; Bernard *et al.*, 2009; Bani *et al.*, 2015) potentiating in smaller hosts. Another factor implied in the infection processes by viroids is the long distance movement inside the phloem that helps reach leaves, roots, and organs far away from those initially infected (Bani *et al.*, 2010). In this investigation, the distance travelled by CEVd in plants with roots of the *in vivo* indexing was greater than in sprouts planted *in vitro*, delaying the infection process, and consequently, the expression of symptoms.

Eficiencia del indexado

Los resultados de este estudio indican que ambos indexados *in vitro* e *in vivo* fueron 99 % eficientes (Cuadro 1). Un protocolo de indexado con una cantidad suficiente de indicadores biológicos puede considerarse eficiente si al menos un indicador biológico expresa síntomas. La cantidad de indicadores biológicos está determinada por el tipo de aislamiento, el tipo de infección o coinfección con otros patógenos y la capacidad de tener al menos un 99 % de eficiencia con una confianza del 95 % (Vidalakis *et al.*, 2004). Los brotes cultivados *in vitro* injertados con callo infectado mostraron síntomas de epinastia, reducción de crecimiento, hojas de tamaño reducido, rugosas y con puntas secas (Figura 3) que coinciden con lo reportado por Kapari *et al.* (2008) en brotes injertados con corteza infectada de CEVd. No se observaron síntomas en los brotes injertados con callo sano ni en los brotes testigo. Las plantas injertadas con yemas infectadas con CEVd presentaron síntomas de epinastia leve a severa, hojas arrugadas y torcidas hacia el envés con grietas de color café claro a oscuro en peciolo y ramas, ampollas en peciolo y crecimiento reducido que concuerdan con reportes de bioensayos de transmisión de CEVd en plantas de *C. medica* Arizona 861-S desarrolladas en invernadero (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a). El uso del cultivo *in vitro* en este estudio demostró ser útil para llevar a cabo la transmisión y desarrollo de síntomas característicos de CEVd con una eficiencia similar a los procedimientos de indexado *in vivo*, tal como se reporta en otros estudios para enfermedades asociadas a viroides en plantas de interés económico (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012). La presencia de síntomas en las muestras puede facilitar el diagnóstico molecular de los viroides (Camps *et al.*, 2014) porque se distribuyen de manera heterogénea en los tejidos de

Indexing efficiency

The results of this study indicate that both *in vitro* and *in vivo* indexing were 99 % efficient (Table 1). An indexing protocol with a sufficient amount of biological indicators can be considered efficient if at least one biological indicator expresses symptoms. The amount of biological indicators is determined by the type of isolation, the type of infection or coinfection with other pathogens and the ability to have an efficiency of at least 99% with a trust of 95 % (Vidalakis *et al.*, 2004). The sprouts planted *in vitro* grafted with infected callus showed symptoms of epinasty, growth reduction, leaves with reduced sizes, rugged, and with dry tips (Figure 3), coinciding with reports by Kapari *et al.* (2008) for sprouts grafted with cortex infected with CEVd. No symptoms were observed in the sprouts grafted with healthy callus or in control sprouts. The plants grafted with buds infected with CEVd showed symptoms of slight to severe epinasty, leaves wrinkled and twisted to the reverse with light to dark brown cracks in petiole and branches, blisters in the petiole and reduced growth, which coincide with CEVd transmission reports of biotests for *C. medica* Arizona 861-S plants grown in greenhouses (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015a). The use of the crop *in vitro* in this study proved to be useful to carry out the transmission and development of characteristic CEVd symptoms with an efficiency similar to the *in vivo* indexing procedures, as reported in other studies for diseases related to viroids in economically important plants (El-DougDoug *et al.*, 2010; Mahfouze *et al.*, 2010; Černi *et al.*, 2012). The presence of symptoms in the samples can simplify the molecular diagnosis of the viroids (Camps *et al.*, 2014) since they distribute themselves homogeneously in the plant tissues (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015b) and it is difficult to determine if the sampled tissue corresponds to the

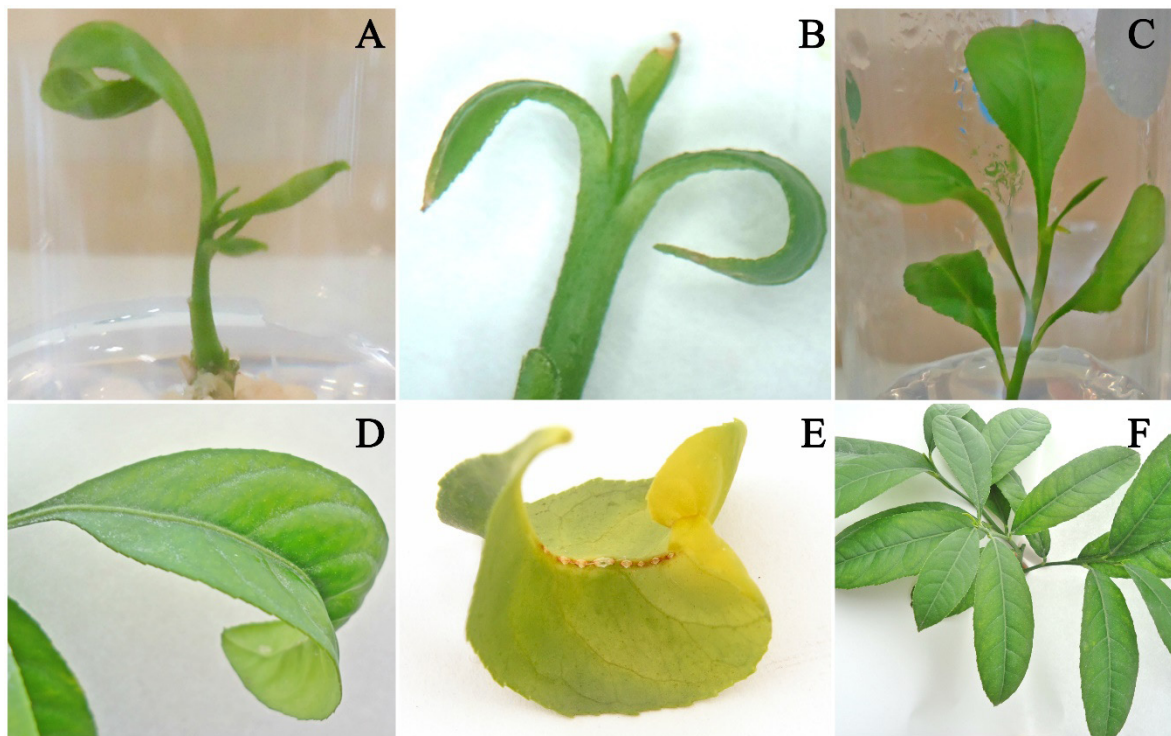


Figura 3. Síntomas asociados a *Citrus exocortis viroid* (CEVd) en brotes de *Citrus medica* inoculados *in vitro* (A epinastia y B: puntas secas) y en plantas cultivadas *in vivo* (D: epinastia y E: grietas en el envés). Brotes (C: sin síntomas) y plantas (F: sin síntomas) testigo.

Figure 3. Symptoms related to *Citrus exocortis viroid* (CEVd) in *Citrus medica* sprouts inoculated *in vitro* (A epinastia and B: dry tips) and in plants planted *in vivo* (D: epinastia and E: cracks on the reverse). Sprouts (C: without symptoms) and control plants (F: without symptoms).

las plantas (Bani *et al.*, 2015; Lin *et al.*, 2015b) y es difícil determinar si el tejido muestreado corresponde al tejido infectado a menos que la expresión de síntomas sirva como indicador.

La evaluación de la eficiencia en los métodos de indexado puede proveer de herramientas para personalizar los procesos a las necesidades específicas. Las condiciones, así como el número de indicadores usados en el diagnóstico puede ajustarse con base en la probabilidad de expresión de síntomas para minimizar el costo general del diagnóstico (Vidalakis *et al.*, 2004). Las condiciones *in vitro* abren una posibilidad de mejora a la dinámica actual del indexado aplicable en los programas de

infected tissue, unless the expression of symptoms serves as an indicator.

The evaluation of the efficiency of indexing methods can provide tools to personalize the processes to specific needs. The conditions, as well as the number of indicators used in the diagnosis, can be adjusted based on the probability of the expression of symptoms to minimize the overall cost of the diagnosis (Vidalakis *et al.*, 2004). The *in vitro* conditions open up a possibility of improvement from the current dynamics of indexing applicable in the propagative material certification programs for citrus plants to quickly discriminate the material infected by CEVd. Viroidal diseases in germplasm

certificación de material propagativo de cítricos para discriminar el material infectado por CEVd de forma rápida. La prevención de enfermedades viroidales en bancos de germoplasma se realiza a través del diagnóstico conjunto de indexado y pruebas de RT-PCR. El cumplimiento de los programas de certificación establecidos por la Organización Europea y Mediterránea de Protección de Plantas (EPPO) y la Organización de Protección de Plantas en América del Norte (NAPPO) han resultado en un control efectivo de enfermedades causadas por viroides (Barba *et al.*, 2003; Gergerich *et al.*, 2015). El procedimiento de indexado *in vitro* desarrollado en este estudio se suma a los esfuerzos de los programas de cuarentena y certificación de germoplasma con métodos alternativos al diagnóstico tradicional que minimicen los riesgos de epidemias causadas por viroides.

CONCLUSIONES

El indexado *in vitro* de CEVd tiene la misma eficiencia que un diagnóstico *in vivo* y requiere de 20 a 40 días menos para alcanzar la máxima incidencia después de la inoculación. El cultivo de callos durante 3 semanas previo a la inoculación requiere ser sustituido por otro tipo de tejido no cultivado para reducir el tiempo total del indexado *in vitro*. El indexado *in vitro* para detección y diagnóstico de CEVd ofrece la posibilidad de sustituir al método tradicional *in vivo* en los procedimientos de certificación de cítricos para la formación de Bancos de Germoplasma.

LITERATURA CITADA

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Molecular Biology* 215: 403-410. [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Argueso CT, Raines T and Kieber JJ. 2010. Cytokinin signaling and transcriptional networks. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 533-539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.08.006>
- Bani HSM, Pensabene BG, Duran VN and Serra P. 2015. Phloem restriction of viroids in tree citrus hosts is overcome by grafting with etrog citron: potential involvement of a translocatable factor. *Journal of General Virology* 96 (8): 2405-2410. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.000154>
- Bani HSM, Barbosa CJ, Serra P and Duran-Vila N. 2010. Effects of resistance of *Eremocitrus glauca* and *Microcitrus australis* to viroid infection: replication, accumulation and long-distance movement of six citrus viroids. *Plant*
- banks are prevented with the joint diagnosis of indexing and RT-PCR tests. The compliance of certification programs established by the European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) and the North American Plant Protection Organization (NAPPO) has resulted in an effective control of diseases caused by viroids (Barba *et al.*, 2003; Gergerich *et al.*, 2015). The *in vitro* indexing procedure developed in this study is another addition to the efforts by the germplasm quarantine and certification programs with alternative methods to the traditional diagnosis that minimize the risks of epidemics caused by viroids.

CONCLUSIONS

The *in vitro* indexing of CEVd has the same efficiency of an *in vivo* diagnosis, and requires between 20 and 40 days less to reach the maximum incidence after inoculation. The culture of callus for 3 weeks before inoculation requires substitution by another unplanted tissue to reduce the total time of the *in vitro* indexing. The *in vitro* indexing for the detection and diagnosis of CEVd offers the possibility of substituting the traditional *in vivo* method in the citrus certification procedures for the formation of germplasm banks.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Pathology 59: 413-421. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02234.x>
- Barba M, Gumpf DJ and Hadidi A. 2003. Quarantine of imported germplasm. pp: 303-311. In: Hadidi A, Flores R, Randles JW and Semancik JS (eds.). Viroids, CSIRO Publishing. Science Publishers Inc., Australia USA. 400p.
- Bernard L, Duran VN and Elena SF. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. Journal of General Virology 90: 2040-2049. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.010769-0>
- Camps R, Castro M and Besoain X. 2014. Simultaneous detection of CTV, CEVd and HSVd using Arizona 861 S1 citron and RT-PCR. Ciencia e Investigación Agraria 41: 255-261. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202014000200012>
- Černi S, Čurković PM, Rusak G and Škorić D. 2012. *In vitro* system for studying interactions between *Citrus exocortis viroid* and *Gynura aurantiaca* (Blume) DC. metabolism and growing conditions. Journal of Plant Interactions 7: 254-261. <http://dx.doi.org/10.1080/17429145.2011.591945>
- Clopper CJ and Pearson ES. 1934. The use of confidence of fiducial limits illustrated in the case of the binomial. Biometrika 26: 404-413. <https://doi.org/10.1093/biomet/26.4.404>
- El-Dougdoug, K. H. A., Osman, M. E., Hayam, A. S., Rehab, D. A., and Reham, E. M. (2010). Elimination of Hop Stunt Viroid from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. Aust. J. Basic Appl. Sci. 4, 54-60.
- Duran VN, Cambra M, Medina V, Ortega C and Navarro L. 1989. Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with citrus tristeza virus and citrus infectious variegation virus. Phytopathology 79: 820-826.
- DGSV, Dirección General de Sanidad Vegetal. 2016. Unidades de Producción de material propagativo de cítricos. Directorio de Bancos de Germoplasma. Ciudad de México. <http://senasica.gob.mx/?doc=24706>.
- El-Dougdoug KHA, Osman ME, Hayam AS, Rehab DA and Reham EM. 2010. Elimination of Hop Stunt Viroid (HSVd) from infected peach and pear plants using cold therapy and chemotherapy. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 4: 54-60.
- EPPO. 2016. Certification schemes. Pathogen-tested citrus trees and rootstocks PM4/12(1). European and Mediterranean plant protection organization. Paris, France. <https://gd.eppo.int/taxon/CEVD00/documents> (consulta febrero, 2016).
- Gergerich RC, Welliver RA, Gettys S, Osterbauer NK, Kamenidou S, Martin RR, Golino DA, Eastwell K, Fuchs M, Vidalakis G and Tzanetakis IE. 2015. Safeguarding fruit crops in the age of agricultural globalization. Plant Disease 99: 176-187. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0762-FE>
- Gouy M, Guindon S and Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution 27(2): 221-224. <http://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Guerrero GCE, Alvarado GOG, Gutiérrez MH, González GR, Álvarez OMG y Luna RM. 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. 31(1): 20-28. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974003>
- Hajeri S, Ramandugu C, Manjunath K, Ng J, Lee R and Vidalakis G. 2011. *In vivo* generated Citrus exocortis viroid progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. Virology 417: 400-409. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.013>
- Kapari IT, Kyriakou A, Papayiannis L, Tsaltas D, Gregoriou S and Psaltis I. 2008. Rapid *in vitro* microindexing of viroids in citrus. Plant Pathology 57(2): 348-353. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01774.x>
- Kovalskaya N and Hammond RW. 2014. Molecular biology of viroid host interactions and disease control strategies. Plant Science 228:48-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.05.006>
- Kumar S, Stecher G and Tamura K. 2016. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution. 33: 1870-1874 <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Laplaze L, Benkova E, Casimiro I, Maes L, Vanneste S, Swarup R, Weijers D, Calvo V, Parizot B, Herrera RMB, Offringa R, Graham N, Doumas P, Friml J, Bogusz D, Beeckman T and Bennett M. 2007. Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. The Plant Cell 19: 3889-3900. <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Lin CY, Wu ML, Shen TL, Yen HH and Hung TH. 2015a. Multiplex detection, distribution, and genetic diversity of Hop stunt viroid and *Citrus exocortis viroid* infecting citrus in Taiwan. Virology Journal 12:11. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0247-y>
- Lin CY, Wu ML, Shen TL and Hung TH. 2015b. A mutual titer-enhancing relationship and similar localization patterns between Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid co-infecting two citrus cultivars. Virology Journal 12:142. <http://dx.doi.org/10.1186/s12985-015-0357-6>
- Mahfouze SA, El-Dougdoug KA and Allam EK. 2010. Production of Potato spindle tuber viroid-free potato plant materials *in vitro*. Journal of American Science 6:1570-1577. <http://doi.org/10.7537/marsjas061210.178>
- Malfitano M, Barone M, Duran-Villa N and Alioto D. 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania southern Italy. Journal of Plant Pathology 87 (2): 115-121. Disponible en línea: <http://www.jstor.org/stable/41998221>
- Mora AG y Acevedo SG. 2016. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad ABCPE ver.1.1. Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.
- Murashige T and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 56: 75. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- NAPPO. 2013. Norma regional de medidas fitosanitarias 16. Medidas integradas para la movilización de material propagativo de cítricos. North American Plant Protection Organization. North Carolina, USA. Disponible en línea: [http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16\\_10-09-2013-s.pdf](http://nappo.org/files/8914/5083/2412/RSPM16_10-09-2013-s.pdf)
- Naseem M and Dandekar T. 2012. The role of auxin-cytokinin antagonism in plant-pathogen interactions. PLOS

- Pathogens 8(11): e1003026. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003026>
- Navas CJ, Moreno P and Durán VN. 1995. Citrus psorosis, ringspot, cristicortis and concave gum pathogens are maintained in callus culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 40: 133-137. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00037666>
- NCBI. 2010. National center for biotechnology information. Nucleotide blast. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (consulta, febrero 2016).
- Palukaitis P. 2014. What has been happening with viroids?. *Virus Genes* 49: 175-184. <http://dx.doi.org/10.1007/s11262-014-1110-8>
- Papayiannis LC. 2014. Diagnostic real time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of Virological Methods* 196:93-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.001>
- Pethybridge SJ, Hay FS, Barbara DJ, Eastwell KC and Willson CR. 2008. Viruses and viroids infecting hop: significance, epidemiology and management. *Plant Disease* 92:3. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-3-0324>
- Roistacher CN. 1991. Graft-transmissible diseases of citrus. Handbook for detection and diagnosis. FAO, Rome. 286 p.
- Saponari M, Loconsole G, Liao HH, Jiang B, Savino V and Yokomi RK. 2013. Validation of high throughput real time polymerase chain reaction assays for simultaneous detection of invasive citrus pathogens. *Journal of Virological Methods* 193: 478-486. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.002>
- Shimizu SS, Tanaka M and Mori HE. 2009. Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology* 69: 429-435. <http://dx.doi.org/10.1007/s11103-008-9416-3>
- Singh RP, Dilworth AD, Ao X, Sing M and Baranwal VK. 2009. Citrus exocortis viroid transmission through commercially-distributed seeds of Impatiens and Verbena plants. *European Journal of Plant Pathology* 124: 691-694. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-009-9440-4>
- Škorić D, Conerly M, Szychowski JA and Semancik JS. 2001. CEVd induced symptom modification as a response to a host specific temperature sensitive reaction. *Virology* 280: 115-123. <http://doi.org/10.1006/viro.2000.0744>
- Statistical Analysis System SAS. 2002. Statistical Analysis System for Windows release 9.0. SAS Inst. Inc., NC, USA.
- Van Brunschot SL, Persley DM, Roberts A and Thomas JE. 2014. First report of pospiviroids infecting ornamental plants in Australia: *Potato spindle tuber viroid* in *Solanum laxum* (synonym *S. jasminoides*) and *Citrus exocortis viroid* in *Petunia* spp. New disease report 29:3. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2014.029.003>
- Vidalakis G, Garnsey SM, Bash JA, Greer GD and Gumpf DJ. 2004. Efficacy of Bioindexing for graft-transmissible citrus pathogens in mixed infections. *Plant Disease* 88: 1328-1334. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1328>
- Yang X, Hadidi A and Garnsey SM. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82:279-28. Disponible en línea: [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n03\\_279.PDF](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n03_279.PDF)