

DETECCION Y CARACTERIZACION DEL COMPLEJO DE VIROIDES DE LOS CITRICOS EN URUGUAY

G. Pagliano; L. Orlando y A. Gravina

Recibido: 6 de julio de 1998. Aceptado: 31 de agosto de 1998.

RESUMEN

Plantas de cidro Etrog Arizona 861 (*Citrus medica* L.) fueron inoculadas con cortezas provenientes de árboles de campo presentando síntomas de enanismo y descortezado del portainjerto y de árboles asintomáticos. A los 3 y 4 meses expresaron reducción del crecimiento, epinastia en hojas, necrosis de nervaduras, puntuaciones en peciolo y síntomas de shock. El análisis de ácidos nucleicos mediante sPAGE, slot blot e hibridación molecular, permitió detectar la presencia de tres grupos de viroides, CVd-I, CVd-II y CVd-III comunicados por primera vez a nivel nacional, asociados al agente causal de la exocortis de los citrú (CEVd). Los viroides caracterizados fueron CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIIa y CVd-IIIb. No se ha detectado la presencia del viroide perteneciente al grupo CVd-IV. Todas las fuentes de campo analizadas presentaron una mezcla del CEVd con viroides pertenecientes a los grupos CVd-I, CVd-II y CVd-III.

PALABRAS CLAVE: Complejo viroides de citrú; exocortis; diagnóstico molecular.

SUMMARY

DETECTION AND CHARACTERIZATION OF CITRUS VIROID COMPLEX IN URUGUAY

Etrog citron Arizona 861 (*Citrus medica* L.) plants were inoculated with bark from different field sources showing dwarfing and bark scaling and from asymptomatic trees. After 3 and 4 months they showed reduced growth, epinasty in leaves, vein necrosis, point necrosis of the petiole and shock symptoms. sPAGE, slot blot and molecular hybridization analysis of nucleic acids allowed to detect the presence of three viroid group, CVd-I; CVd-II and CVd-III first reported in our country, associated with the causal agent of citrus exocortis (CEVd). The viroids which were characterized were CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIIa and CVd-IIIb. Presence of the viroid from group CVd-IV has not been detected. All the tested field sources showed a mixture of CEVd with viroids of the groups CV-I, CVd-II and CVd-III.

KEY WORDS: citrus viroid complex; exocortis; molecular diagnostic.

INTRODUCCION

Una de las problemáticas más relevantes de la producción de citrú a nivel nacional y mundial es la alta incidencia de enfermedades provocadas por virus y viroides (tristeza, psorosis, exocortis, caquexia-xiloporosis), causando importantes pérdidas económicas en la mayoría de los países productores (Martínez *et al.*, 1991).

A nivel nacional han sido reportadas tristeza, enfermedad endémica con la que se convive mediante el uso de portainjertos resistentes; psorosis, enfermedad que actualmente causa las mayores pérdidas económicas y exocortis, de menor incidencia actual, pero de un mayor riesgo potencial debido a que la citricultura uruguaya esta injertada en más del 90% sobre *Poncirus trifoliata* L. Raf.,

portainjerto altamente susceptible a esta enfermedad. A partir de la década del 40, cuando se comienza a adoptar este portainjerto por su resistencia a tristeza, se observa que árboles injertados sobre este pie manifiestan reducción en el tamaño, debilitamiento, descortezado a nivel del portainjerto, reducción en rendimientos y calidad de fruta, y acortamiento de su vida útil. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en California, por Fawcett y Klotz en 1948.

El agente causal de la exocortis es el viroide del CEVd (Citrus Exocortis Viroid), identificado por Semancik y Weathers (1972). El indicador más utilizado es el cidro Etrog Arizona 861 (Calavan *et al.*, 1964) por su mayor sensibilidad y evolución rápida de síntomas (Roistacher *et al.*, 1977). Posteriormente se identificaron en cidro, complementado por sPAGE, viroides más pequeños que el CEVd, relacionados al complejo de viroides de citrú y pertenecientes a los grupos CVd-I, CVd-II, CVd-III y CVd-IV (Duran-Vila *et al.*, 1986, 1988). La expresión de síntomas

en cidro varía desde 1 mes (CEVd) hasta 6 a 9 meses (CVd-II) en condiciones favorables (28-32°C). Para que el bioensayo sea fiable, en el Programa de Certificación se realiza una defoliación que permita una segunda lectura de síntomas, comprendiendo de 9 a 12 meses en total. Los Programas de Certificación actualmente vigentes, utilizan para el diagnóstico sanitario plantas indicadoras complementadas con métodos serológicos para el caso de algunos virus. El análisis de ácidos nucleicos de los cidros inoculados mediante sPAGE y tinción de nitrato de plata proporciona un método alternativo a los métodos convencionales mejorando la sensibilidad del diagnóstico y acortando la duración del ensayo. Para el caso del grupo CVd-II permite acortar el período de diagnóstico a 2 - 3 meses, (Duran-Vila *et al.*, 1994) lo que constituye una tercera parte del tiempo necesario para el indexaje biológico.

El objetivo de este trabajo fue detectar la existencia de otros viroides asociados al viroide de la exocortis de los cítricos en Uruguay y su caracterización.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

Se utilizaron 20 fuentes de material de campo, de las

cuales 15 presentaban sintomatología de descascarado y enanismo correspondientes a pomelo Marsh Seedless, (*Citrus paradisi* Mcf.) naranjas Valencia Late y Washington Navel (*Citrus sinensis* L. Osb.) y 5 fuentes asintomáticas para exocortis, de naranja Washington Navel, de 15 a 20 años de edad, pertenecientes a predios del sur y norte del país (Rincón de Pando, Kiyú y Paysandú) (Fig.1; Cuadro 1). El material colectado fue inoculado mediante injerto de corteza en plantas de cidro Etrog Arizona 861, sobre pie de limón rugoso (*Citrus jambhiri* Lush). Luego de la aparición de síntomas, se realizó injerto de aproximación de la indicadora herbácea *Gynura aurantiaca* con cidros sintomáticos conteniendo el CEVd, CVd-I, CVd-II y CVd-III (Weathers *et al.*, 1967). Como testigos negativos se utilizaron cidros clonales y *Gynuras* propagadas por estacas y como testigos positivos cidros y *gynuras* del banco de viroides de la Facultad de Agronomía. En ambos casos, las plantas recién injertadas se mantuvieron en invernáculo a 18-25°C, y luego se trasladaron a cámara de crecimiento (30-32°C, 120µM s⁻¹ m⁻², 16 horas de fotoperíodo) para lograr una adecuada replicación de los viroides y expresión de síntomas. Complementariamente se utilizaron cidros inoculados con corteza de dos plantas obtenidas mediante microinjerto, previo a la incorporación en el Programa de Saneamiento.



Figura 1- Arbol de pomelo Marsh Seedless con sintomatología de enanismo y descortezado en portainjerto.

Cuadro 1. Síntomas inducidos por viroides en árboles de campo y en planta indicadora (Cidro Etrog Arizona 861).

Variedad*	Identificación	SINTOMATOLOGIA						
		Arbol de campo		Planta indicadora				
		Enanismo	Descortezado	Enanismo	Epinastia en hoja	Necrosis en nervaduras	Puntuaciones en peciolo	Shock
Marsh Seedless	030; 031; 043;							
	052; 149	S	S	S	S	S	S	S
	032	S	M	M	M	M	M	-
	044; 054	S	S	S	S	S	M	M
W. Navel	055; 056	S	S	M	S	S	S	S
	146; 151	M	S	S	S	S	S	M
	147	M	S	S	M	S	M	M
	150	S	M	S	S	S	S	S
	205	-	-	M	S	S	S	S
	201; 206; 208	-	-	S	S	S	S	S
	207	-	-	M	S	S	M	S
	012	S	S	S	S	S	S	S

* Injertada sobre *Poncirus trifoliata* L.Raf. S: severo M: moderado a suave

Extracción de ácidos nucleicos y electroforesis

Los ácidos nucleicos fueron extraídos de hojas y brotes tiernos de plantas indicadoras que presentaron severa sintomatología de exocortis, 3 a 4 meses después de la inoculación. Se recogieron 5 g de tejido y se trituraron en nitrógeno líquido con 5 ml de buffer de extracción (0.4mM Tris-HCL, pH 8.9; 0.1% SDS; 5 mM EDTA, pH 7.0; pH 7.0; 4% 2-mercaptoetanol) y 15 ml de fenol saturado en agua y neutralizado a pH 7.0. Los ácidos nucleicos totales fueron precipitados de la fase acuosa con etanol y resuspendidos en buffer TKM (Maniatis *et al.*, 1989). Los ácidos nucleicos se sometieron a una partición en 2M LiCl, y la fracción soluble se concentró por precipitación en etanol y se resuspendió en buffer TKM (Semancik *et al.*, 1975). Las preparaciones obtenidas se sometieron a electroforesis secuencial (sPAGE) (Semancik y Harper, 1984).

Se analizaron alícuotas de 20 µl equivalentes a 500 mg de peso fresco utilizando gel de poliacrilamida al 5% (12x19x0.3 cm), en buffer TAE (Maniatis *et al.*, 1989). El gel se corrió durante 3 h a 60 mA de corriente constante a 4°C (Morris y Wright, 1975) y se tiñó con bromuro de etidio. Se cortó una sección del gel de 1.5 cm de ancho, conteniendo la zona de viroides comprendida entre el CEVd y 7s ARN (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986) y se colocó en la parte superior de un segundo gel de poliacrilamida al 5% en condiciones desnaturizantes, urea 8M en buffer TAE pH 6.5. Este gel se sometió a corriente constante de 18 mA durante 6 h a temperatura ambiente (Sänger *et al.*, 1979). Las formas circulares de los viroides se visualizaron con tinción de nitrato de plata (Igloi, 1983). Para la caracterización se utilizaron estándares de cada grupo de viroides, cedidos por la Dra. Duran-Vila N. (I.V.I.A-España), un ais-

lado procedente de California (CVd-Ia, CVd-IIa y CVd-IIIb) cedido por la Dra. Marta Francis (M.G.A.P.-Uruguay) y una mezcla artificial de viroides (008)CEVd, CVd-Ia, CVd-IIa, CVd-IIIa, CVd-IIIb del banco de viroides de Facultad de Agronomía.

Electrotransferencia y slot blot

Los ácidos nucleicos se electrotransferieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (ImmobilonTM-N, Millipore) para hibridación molecular, utilizando buffer TBE (Maniatis *et al.*, 1989). Las membranas se pretrataron con etanol 70% (3 seg), agua (2 min) y buffer TBE (15 min). La electrotransferencia se realizó a 60V durante 1 h y las membranas se secaron al vacío a 80°C por 2 h. Para complementar el diagnóstico se realizaron slot blots con 10 ml de las preparaciones de ácidos nucleicos desnaturizados con formaldehído 40% a 60°C por 15 min, sobre membranas de nylon (Boehringer Mannheim), pretratadas con buffer 20X SSPE (Maniatis *et al.*, 1989). Las membranas se hibridaron con sondas de cDNA o cRNA marcadas con digoxigenina.

Sondas de viroides

Se obtuvieron sondas marcadas con digoxigenina usando el plásmido recombinante pT7-Blue (Novagen), conteniendo un DNA monomérico del viroide completo. Se sintetizaron sondas de RNA monomérico complementaria a la secuencia completa del viroide, mediante reacción de transcripción con la RNA polimerasa T7 en presencia de UTP (Boehringer Mannheim) marcado con digoxigenina. Las sondas de DNA monomérico completas marcadas con digoxigenina, se sintetizaron por amplificación de PCR en

50 µl de volúmen de reacción conteniendo 0.5 mM de cada primer, 1.5 mM MgCl₂, 120 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (conteniendo UTP marcado con digoxigenina) y 1U de Taq DNA polimerasa (Promega). La reacción consistió de un paso de desnaturalización de 5 min a 95 °C, 35 ciclos (10 seg a 92°C, 10 seg a 50°C y 20 seg a 72°C) y un paso final de extensión de 5 min a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% para verificar la presencia de la banda esperada. La concentración de DNA se estimó por espectrofotómetro (Maniatis *et al.*, 1989) y la cantidad de DNA marcado con digoxigenina se estimó frente a un control positivo comercial (Promega).

Hibridización y detección

La prehibridización e hibridización se realizaron en formamida 50% y 20X SSPE (Maniatis *et al.*, 1989). Las membranas fueron prehibridadas a 42°C por 2-4 h e hibridizadas toda la noche a 65°C (sondas cRNA) o 50°C (sondas cDNA). Después de la hibridización se lavaron dos veces en 2X SSC; 0.1% SDS a temperatura ambiente por 15 min, seguido por otro lavado en 0.1X SSC, 0.1% SDS por 60 min a 68°C (sondas cRNA) o 60°C (sondas cDNA). Los ácidos nucleicos marcados con digoxigenina fueron detectados con un conjugado anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina (Fab fragments) y visualizados con el sustrato NBT (4-nitro blue tetrazolium chloride) y X-fosfatasa o con el sustrato quimioluminiscente CSPD (DIG Nucleic Acid Detection kit, Boehringer Mannheim).

RESULTADOS

Sintomatología en planta indicadora

Las plantas indicadoras de cidro Arizona Etrog 861 inoculadas con material de campo de las 20 fuentes, expresa-

ron diferentes sintomatología a los 3 y 4 meses de su inoculación. El material proveniente de árboles de pomelo Marsh Seedless, naranjas Washington Navel y Valencia Late, con síntomas de enanismo y descortezado a campo, al ser inoculado en planta indicadora mostró en el 100% de los casos disminución del crecimiento, epinastia en hoja, necrosis de nervaduras y puntuaciones en el peciolo y en un 92% síntomas de shock (Fig. 2; Cuadro 1). Una de las fuentes de pomelo (044), además de la sintomatología característica expresó síntoma de flexión en ambos extremos de algunas hojas (Fig. 2F). No obstante, cuando se inocularon cidros con material de campo de naranja Washington Navel, sin síntomas de enanismo y descortezado, manifestaron síntomas característicos de exocortis, con igual grado de severidad que cidros inoculados con material sintomático.

La inoculación de diferentes fuentes de campo conteniendo mezclas de viroides (CEVd, CVd-I, CVd-II y CVd-III) en *Gynura aurantiaca*, causaron síntomas característicos de exocortis manifestando, disminución en el crecimiento, rugosidad en hoja y necrosis de nervaduras, permitiendo aislar el viroide del CEVd (Fig. 2 derecha).

Detección y caracterización del CEVd y de los viroides de los grupos CVd-I, CVd-II y CVd-III. Electroforesis secuencial (sPAGE)

Los resultados obtenidos por sPAGE confirmaron la presencia del CEVd y permitieron detectar viroides correspondientes a los grupos CVd-I, CVd-II y CVd-III, no encontrándose el grupo CV-IV. En las muestras analizadas de cidros inoculados con material sintomático y asintomático de campo, se detectó el CEVd con distintas combinaciones de viroides pertenecientes a los tres grupos antes citados. Ocho de las muestras analizadas presentaron una mezcla

Cuadro 2. Caracterización de los viroides de los cítricos mediante planta indicadora, sPAGE y slot blot.

Variedad*	Identificación	CEV d	CVd-Ia	CVd-Ib	CVd-IIa	CVd-IIIa	CVd-IIIb
Marsh Seedless	030, 031, 043, 044, 052, 054, 055, 056.	+	+	-	+	+	-
	032	+	-	+	+	+	-
	W. Navel	147, 151, 201, 205, 207, 208.	+	-	+	+	-
W. Navel	146	+	-	+	+	-	+
	149	+	+	-	+	+	+
	150	+	-	+	+	+	+
	206	+	+	+	-	+	-
	Valencia	012	+	+	-	+	+

* Injertada sobre *Poncirus trifoliata* L.Raf.

Figura 2- Sintomatología en cidro Arizona 861 y *Gynura aurantiaca* posterior a la inoculación con distintas fuentes de campo con sintomatología de enanismo y descascarado en portainjerto.

A: Cidro sano (izquierda), cidro con síntomas severos de epinastía en hoja y disminución del crecimiento, producidos por la inoculación del CEVd y viroides (derecha).

B: Cidro sano (derecha), cidro con severa epinastía y disminución del crecimiento de la hoja inducido por el CEVd (medio), *Gynura* con rugosidad en hoja (derecha).

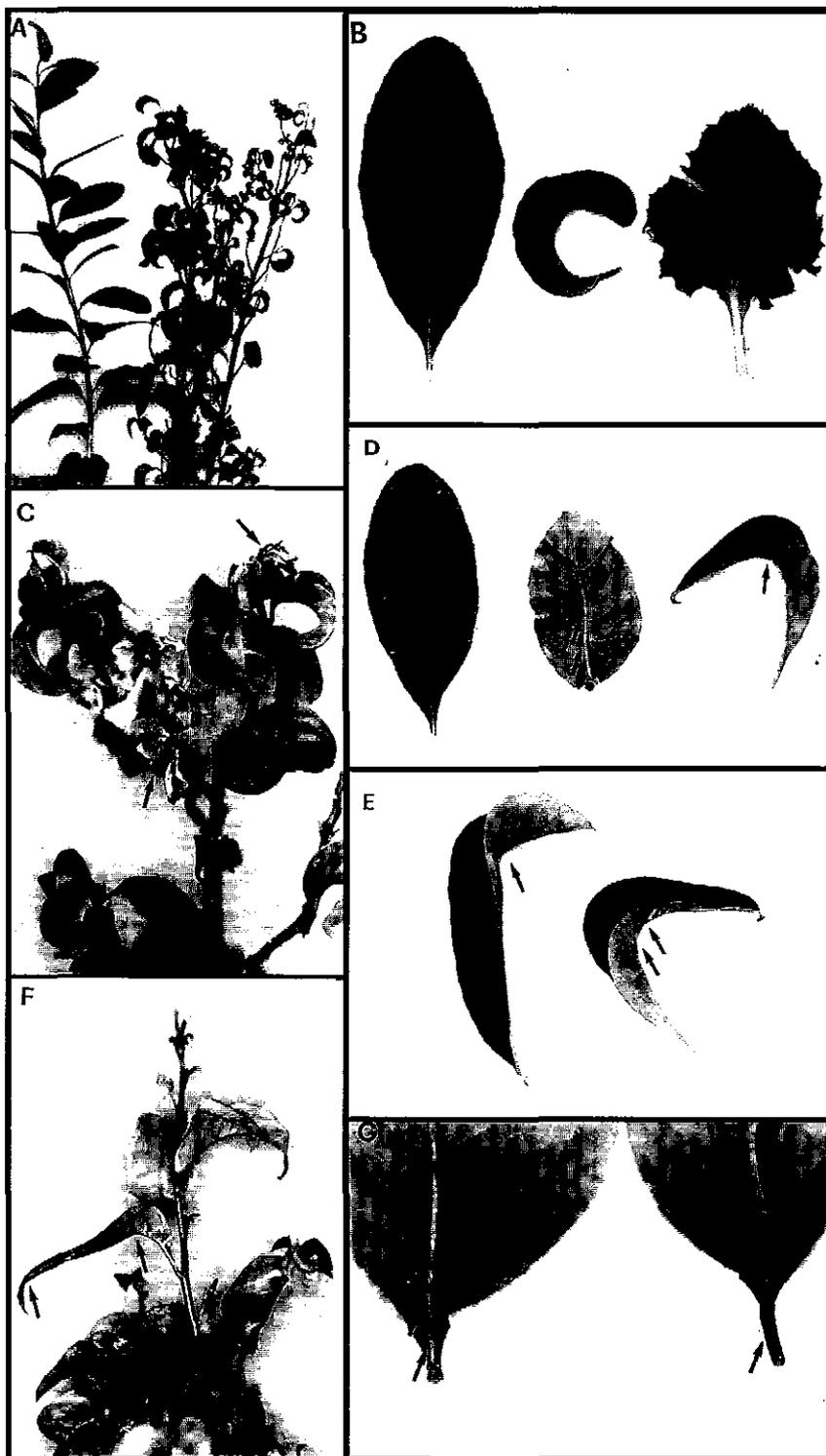
C: Sintomatología de shock causada por la severidad del CEVd y viroides CVD-I, CVD-II y CVD-III.

D: Control sano (izquierda), hojas de cidro con puntuaciones necróticas en nervadura producida por el grupo CVD-Ia (medio) causando flexión en hoja (derecha).

E: Flexión en hoja de cidro causada por CVD-Ia

F: Síntoma aún no reportado causando flexión en ambos extremos de la hoja, similar al síntoma reportado por Gilling et al., 1988. Probablemente perteneciente al grupo CVD-I (Duran-Vila N., com.pers.)

G: Hoja de cidro con necrosis en peciolo inducido por los grupos CVD-I y CVD-III (izquierda).



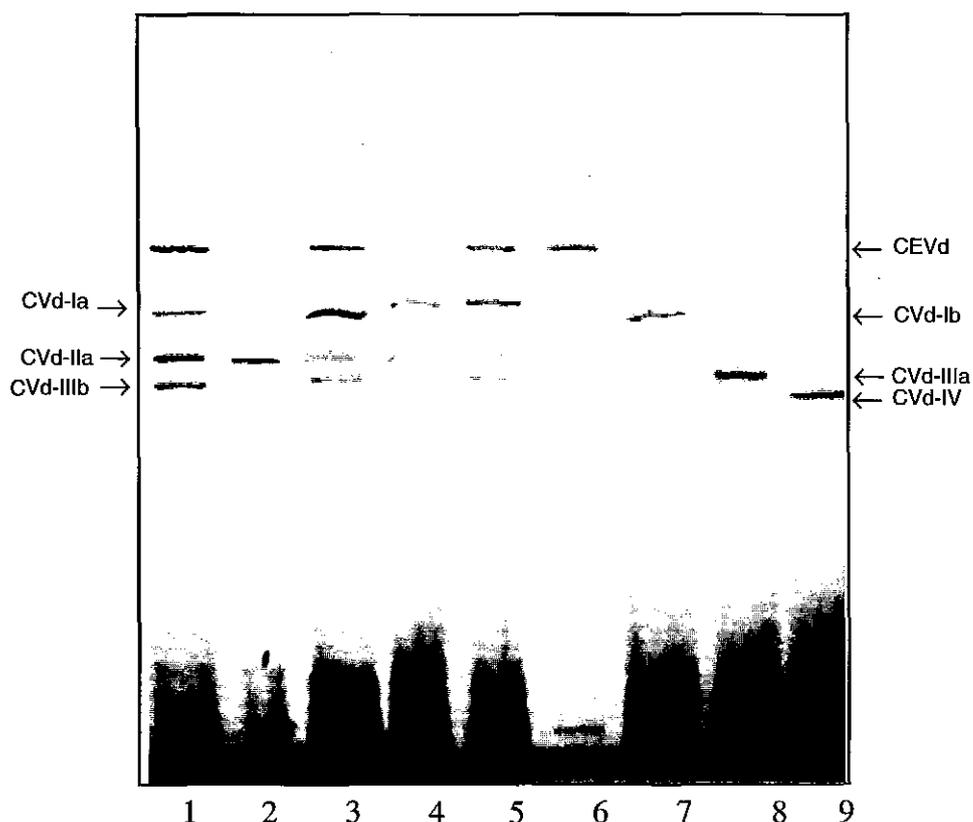


Figura 3: Electroforesis en gel de poliacrilamida de extractos de ácidos nucleicos bajo condiciones desnaturizantes. Las muestras corresponden a los aislados 146; 147 y 030 (carreras 1, 3 y 5 respectivamente); controles positivos: aislado CVd-Ia, CVd-IIa y CVd-IIIb de California (carrera 4) y aislados puros de CEVd; CVd-Ib; CVd-IIa; CVd-IIIa y CVd-IV de España (carreras 6, 7, 2, 8 y 9 respectivamente).

de viroides conteniendo el CEVd, y movilidades iguales al CVd-Ia, CVd-IIa y CVd-IIIa; siete de ellas presentaron el CEVd en combinación con CVd-Ib, CVd-IIa y CVd-IIIa, y en cinco muestras se encontraron otras asociaciones diferentes (146, 149, 150, 206 y 012) (Cuadro 2).

El estudio de la distribución porcentual de los viroides reflejó que un 100% correspondió al CEVd; 50% al CVd-Ia; 62.5% al CVd-Ib; 87.5% a los viroides CVd-IIa y CVd-IIIa y un 37.5% al viroide CVd-IIIb. (Cuadro 2). Los viroides detectados en la muestra 147 fueron caracterizados como CEVd, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIIa y los encontrados en la muestra 030 como CEVd, CVd-Ia, CVd-IIa, CVd-IIIa (Fig. 3 carreras 1 y 3 respectivamente).

Hibridación de electrotransferencia y slot blot.

Los resultados confirmaron la presencia del CEVd y

viroides de los grupos CVd-I, CVd-II y CVd-III en las muestras analizadas, cuando se hibridó con sondas de cDNA y cRNA marcadas con digoxigenina. En ninguno de los casos se detectó presencia del grupo CVd-IV.

En la Fig.4A se muestra una electrotransferencia de ácidos nucleicos hibridada con la sonda del CEVd. Las muestras pertenecen a cidros inoculados con material de campo sintomático, mostrando una total correspondencia (carreras 1, 2 y 3) con el aislado puro de CEVd usado como control positivo (carrera 5). La Fig.4B corresponde a la hibridación con la sonda del grupo CVd-I, detectándose presencia de los viroides con movilidades iguales a CVd-Ia (carreras 1, 2 y 5) y CVd-Ib (carrera 3). En la Fig.4C se observan los resultados obtenidos al hibridar con la sonda del grupo CVd-III, detectándose los viroides con movilidades iguales al CVd-IIIa (carreras 1 y 2) y CVd-IIIb (carreras 5 y 6). La Fig. 4D muestra los resultados de hibridación con la sonda correspondiente al CVd-IV, no observándose señal po-

sitiva en ninguna de las muestras analizadas en relación al testigo positivo (carrera 4).

Los resultados de slot blot hibridados con sondas de cDNA marcadas con digoxigenina para cada uno de los viroides, confirmaron la presencia del CEVd, CVd-I, CVd-II y CVd-III. En la Fig. 5A se observa la detección de viroides correspondientes al grupo CVd-I en aislados de cidros pertenecientes a distintas fuentes de campo sintomáticas y asintomáticas. Cuando se analizaron muestras

de plantas obtenidas mediante microinjerto, previo a su incorporación en el Programa de Saneamiento, este grupo no fue detectado (Fig.5A 6-i y 7-i). En la Fig.5B se muestran los resultados encontrados en el grupo CVd-II. Utilizando los mismos aislados de cidro que en el caso anterior, se detectó la presencia de viroides correspondientes a este grupo en todas las muestras. En una de las plantas proveniente de microinjerto, se lo detectó en baja concentración (Fig.5B 7-i).

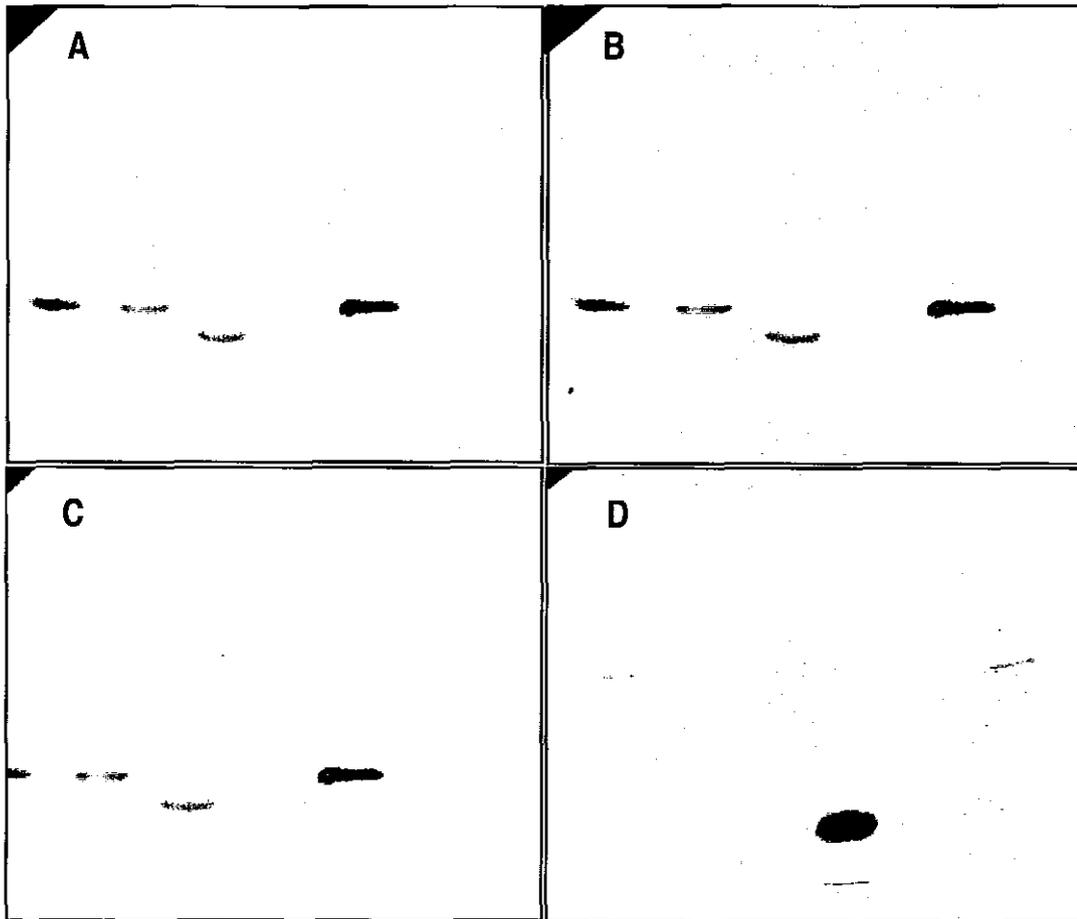


Figura 4: Electrotransferencias de preparaciones de ácidos nucleicos de cidros inoculados con aislados de campo de pomelo Marsh Seedless y naranja Washington Navel. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina.

A: Aislados 030, 032 y 044 (carreras 1, 2 y 3 respectivamente); control negativo aislado puro de CVd-I (carrera 4); control positivo de aislado puro de CEVd (carrera 5), hibridados con sonda cDNA del CEVd y revelados por colorimetría.

B: Aislados 030, 044 y 147 (carreras 1, 2 y 3 respectivamente); control negativo aislado puro de CVd-II (carrera 4); control positivo aislado puro de CVd-I (carrera 5), hibridados con sonda cDNA del CVd-I y revelados por colorimetría.

C: Aislados 030, 032, 149 y 150 (carreras 1, 2, 5 y 6 respectivamente); controles positivos: CVd-III (carrera 3) y CEVd, CVd-Ia, CVd-IIa, CVd-IIIa, CVd-IIIb (mezcla artificial de viroides) (carreras 4), hibridados con sonda cDNA del CVd-III y revelados por quimioluminiscencia.

D: Aislados 030 y 150 (carreras 1 y 6 respectivamente); controles negativos: CVd-Ia CVd-IIa CVd-IIIb (carrera 2); CVd-II (carrera 3) y CVd-III (carrera 5); control positivo de aislado puro de CVd-IV (carrera 4), hibridados con sonda cDNA del CVd-IV y revelados por colorimetría.

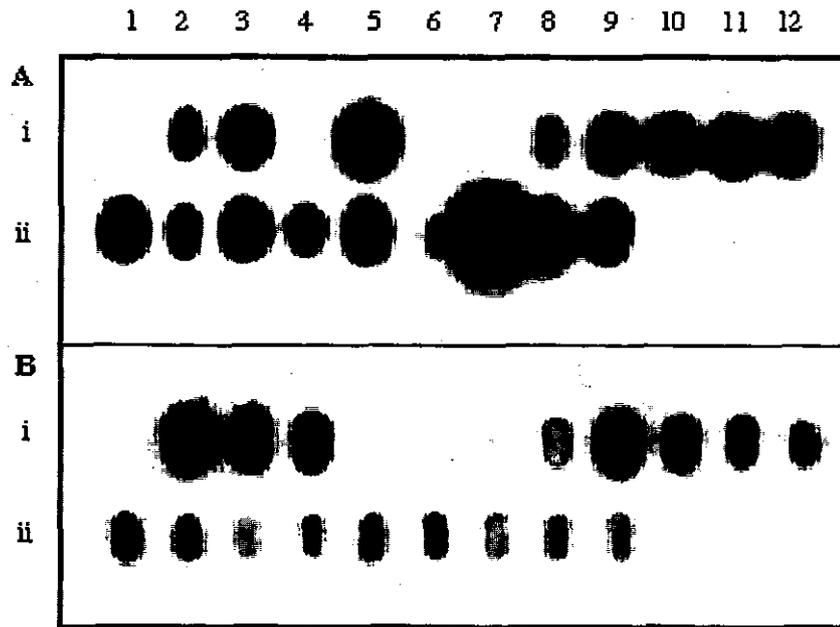


Figura 5: Autorradiografía de slot blot después de hibridación con sondas de cDNA de los viroides CVd-I (A) y CVd-II (B) marcadas con digoxigenina, a partir de ácidos nucleicos de cidros inoculados con aislados de campo y microinjertos. El orden de las muestras en ambas figuras es el mismo.

1-i) control negativo (cidro clonal); 2-i) controles positivos: CVd-I (A) y CVd-II (B); 3-i) control positivo CVd-Ia, CVd-IIa, CVd-IIb; 4-i) aislado puro CVd-II; 5-i) aislado puro CV-I; 6-i y 7-i) microinjertos previa introducción en Programa de Sancaamiento; 8-i) muestra asintomática en campo (201); 9-i) aislado 030; 10-i) aislado 031; 11-i) aislado 043; 12-i) aislado 044.

1-ii) aislado 146; 2-ii) aislado 147; 3-ii) aislado 149; 4-ii) aislado 151; 5-ii) aislado 052; 6-ii) aislado 012; 7-ii) aislado 054; 8-ii) aislado 055; 9-ii) aislado 056; 10, 11 y 12-ii) libres.

DISCUSION

Los síntomas en plantas indicadoras obtenidos en este estudio a partir de plantas sintomáticas de campo, se corresponden con anteriores reportes de Duran-Vila *et al.*, (1988) en España, Gillings *et al.*, (1988) en Australia y Semancik *et al.* (1993) en Estados Unidos, con la excepción de la sintomatología de shock, no reportada por los anteriores autores. Sin embargo, las mismas sintomatologías en cidro, se obtuvieron a partir de 5 fuentes de campo que no presentaron ni enanismo ni descortezado del portainjerto (Cuadro 1). Este hecho puede deberse a una infección mecánica en campo en plantas adultas o a la presencia de una raza de CEVd que no induce descortezamiento en trifolia y/o enanismo (Duran-Vila com.pers.). Estos datos coinciden con resultados obtenidos por Gillings *et al.* (1988) quien reporta la existencia de una planta de campo de limón Frost Lisbon de tamaño normal, conteniendo sólo el CEVd, sugiriendo que árboles conteniendo este viroide no tienen porque expresar necesariamente enanismo. Formas suaves de exocortis, caracterizadas por descortezado sin enanismo o enanismo sin descortezado, han sido reportadas por Fraser & Levitt, (1959) y Broadbent *et al.*, (1971). Una fuente de

campo de pomelo Marsh Seedless manifestó doble flexión en hojas en forma persistente, coincidente parcialmente con la descripción de Gillings *et al.* (1988), quien reporta este mismo síntoma en naranja Keenan Valencia en forma transitoria. Este síntoma puede ser causado por el grupo CVd-I (Duran-Vila, com.pers.) (Figura 2F). Ensayos de infectividad en plantas indicadoras de *Gynura aurantiaca* con cidros sintomáticos conteniendo el CEVd, CVd-I, CVd-II y CVd-III, mostraron que sólo el CEVd fue capaz de replicarse e inducir síntomas en este hospedero herbáceo debido a su selectividad por este viroide, visualizándose después de la electroforesis en gel de poliacrilamida (Semancik y Weathears, 1972). Trabajos recientes a nivel nacional han logrado aislar, caracterizar (Peyrou *et al.*, 1997) y clonar (Del Campo *et al.*, 1997) el viroide de la exocortis a partir del aislado (008). La secuencia obtenida del CEVd correspondió a un peso molecular de 373 nucleótidos, presentando secuencias homólogas con el ARN del CEVd caracterizado en otros países de 371 nucleótidos (Gross *et al.*, 1982; Vjsvader *et al.*, 1982; Semancik *et al.*, 1975; Duran-Vila *et al.*, 1988; Francis *et al.*, 1995). Se han reportado variantes del CEVd, estrechamente relacionadas de 371 a 375 nucleótidos, comprendiendo un grupo único, descritas por

Cuadro 3. Viroides de los cítricos reportados en algunos países.

Grupo	Viroides	Nucleótidos reportados*	Viroides caracterizados			
			España	EE.UU.	Australia	Uruguay
I	CEVd	375-371	+	+	+	+
	CVd-Ia	340	+	+	-	+
	CVd-Ib	332-330	+	+	+	+
	CVd-Ic	317	-	-	+	-
II	CVd-IIa	304-302	+	+	+	+
	CVd-IIb	300-299	+	+	+	-
	CVd-IIc	297	+	+	+	-
III	CVd-IIIa	294-292	+	+	+	+
	CVd-IIIb	290	+	+	+	+
	CVd-IIIC	285	+	+	-	-
	CVd-IIId	280	+	+	-	-
IV	CVd-IV	275	+	+	-	-

*En Uruguay se secuenció el CEVd; los demás viroides se caracterizaron con estándares puros de España.

Visvader y Symons (1983, 1985) (Cuadro 3).

El análisis de ácidos nucleicos mediante sPAGE, electrotransferencia y slot blot, de cidros inoculados con varias fuentes de exocortis colectadas en campo mostrando síntomas característicos de la enfermedad y en algunas plantas asintomáticas, confirmaron la presencia del CEVd y revelaron, por primera vez a nivel nacional, la existencia de ARNs de menor peso molecular que el CEV-ARN, pertenecientes a los grupos CVd-I, CVd-II y CVd-III, no detectándose el grupo más pequeño correspondiente al viroide CVd-IV. Estos ARNs migraron en la región correspondiente a viroides circulares en el gel de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes. En las 20 muestras analizadas en este trabajo se encontró la presencia del CEVd y de los viroides con movilidades iguales a CVd-Ia, CVd-Ib, CVd-IIa, CVd-IIIa y CVd-IIIb. Las muestras analizadas presentaron diferentes combinaciones de viroides, encontrándose en todos los casos el CEVd, seguido del CVd-IIa y CVd-IIIa, luego el CVd-Ib, el CVd-Ia y con menor frecuencia el CVd-IIIb (Cuadro 3). Los viroides se caracterizaron con estándares de todos los grupos, encontrándose dentro del grupo CVd-I los viroides CV-Ia y CVd-Ib, en el grupo CVd-II el viroide CVd-IIa y en el grupo CVd-III el viroide CVd-IIIa y CVd-IIIb (Cuadro 2).

Este primer avance en la caracterización del complejo de viroides de la exocortis en Uruguay, es la base para una posterior clonación y secuenciación del mismo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente a la Dra. Nuria Duran-Vila y a su equipo de trabajo por su colaboración en el ajuste y realización de las técnicas empleadas y permanente apoyo durante el desarrollo de esta investigación.

Proyecto financiado por el BID-CONICYT, N° 171.

BIBLIOGRAFIA

- BROADBENT P., GOLLNOW B.I., GILLINGS M.R. and BENNINGTON K.B. 1988. Root grafting and mechanical transmission of citrus exocortis viroid within a citrus budwood multiplication block. In: Proc. 10th Conf. IOCV: 197-203. Riverside, California.
- CALAVAN E. C., FROLICH, E.F., CARPENTER J. B., ROISTACHER C.N., and CHRISTIANSEN D.W. 1964. Rapid indexing for exocortis of citrus. *Phytopathology*. 54: 1359-1362.
- DEL CAMPO R., PEYROU M., PONCE DE LEÓN I., PAGLIANO G., ORLANDO L., GRAVINA A., WETTSTEIN R. y FRANCIS M. Clonado del viroide de la exocortis de los cítricos y su uso para diagnóstico por hibridación molecular. 1997. Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología, p.28. Montevideo, Uruguay.
- DURAN-VILA, N., FLORES, R. and SEMANCIK, J.S. 1986. Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology*. 150:75-84.
- DURAN-VILA, N., ROISTACHER C.N., RIVERA-BUSTAMANTE R., and SEMANCIK J.S. 1988. A definition of citrus viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *Journal of General Virology*. 69: 3069-3080.
- DURAN-VILA, N., PINA J.A., BALLESTER J.F., JUÁREZ J., ROISTACHER C.N., RIVERA-BUSTAMANTE R., and SEMANCIK J.S. 1988. The citrus exocortis disease: A complex of viroid RNAs. In: Proc. 10th Conf. IOCV: 152-164. Riverside, California.
- DURAN-VILA N., NAVARRO L. y PINA J.A. 1994. Detección de viroides en cítricos. *Invest. Agrar.: Fuera de Serie N°2*, p. 243-252.
- FAWCETT, H. and L.J. KLOTZ 1948. Exocortis of Trifoliolate Orange. *Citrus leaves*. 28 (4): 8-9.
- FRASER, L.R. and LEVITT, E. C. 1959. Recent advances in the study of exocortis (scaly-butt) in Australia. In J. M. Wallace

- (ed.) *Citrus Virus Diseases*: 129-133. Univ. Calif. Agr. Sci., Berkeley, California.
- FRANCIS M.I., SZYCHOWSKI J.A. and SEMANCIK J.S. 1995. Structural sites specific to citrus viroid groups. *Journal of General Virology*. 76: 1081-1089.
- GILLINGS M.R., BROADBENT P., GOLLNOW B.L. 1988. Viroids in Australian Citrus. In: *Proc. 6th International Citrus Congress*, p. 881-895. Tel Aviv, Israel.
- GROSS H.J., KRUPP G., DOMDEY H., RABA M., JANK P., LOSSOW C., ALBERTY H., RAMM K. and SÄNGER H.L. 1982. Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chysanthemum stunt viroid. *European Journal of Biochemistry*. 121: 249-257.
- IGLOID, G.L. 1983. A silver stain detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electroforesis. *Analytical Biochemistry*. 134: 184-188.
- MANIATIS T., FRITSCH E.F. and SAMBROOK J. 1989. *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2d ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- MARTÍNEZ, D., GRAVINA, A. y OLANO, A. 1991. Una visión general de los programas de certificación en Citrus. *Citrus*: 32-34. *Revista de la Comisión Honoraria Nacional del Plan Citrícola*.
- MORRIS, T.J. and WRIGHT, N.S. 1975. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic nucleic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid. *Am. Potato J.* 53:57-63.
- PEYROU M., DEL CAMPO R., PONCE DE LEÓN I., PAGLIANO G., ORLANDO L., GRAVINA A. WETTSTEIN R. y FRANCIS M. 1997. Aislamiento y caracterización del viroide de la exocortis de los cítricos en el Uruguay. *Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, p.27. Montevideo, Uruguay.
- RIVERA-BUSTAMANTE R., GIN R., and SEMANCIK J.S. 1986. Enhanced resolution of circular and linear forms of viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Analytical Biochemistry*. 156: 91-95.
- ROISTACHER, C.N., CALAVAN E.C., BLUE R.L., NAVARRO L. and GONZÁLEZ L. 1977. A new more sensitive indicator for detection of mild isolates of citrus exocortis viroid (CEV). *Plant Disease Reporter*. 61: 135-139.
- SÄNGER H. L., RAMM K., DOMDEY H., GROSS H.J. HENCO K. and RIESNER D. 1979. Conversion of circular viroid molecules to linear strands. *FEBS Letters*. 99: 117-121.
- SEMANCIK, J.S. and HARPER K.L. 1984. Optimal conditions for cell-free synthesis of citrus exocortis viroid and the question of specificity of RNA polymerase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4429-4433.
- SEMANCIK, J.S. and WEATHERS L.G. 1972. Exocortis disease: evidence for a new species of "infectious" low molecular weight RNA in plants. *Nature New Biology*. 237: 242-244.
- SEMANCIK, J.S. and WEATHERS L.G. 1972. Exocortis virus: An infectious free-nucleic acid plant virus with unusual properties. *Virology*. 47: 456-466.
- SEMANCIK J.S., MORRIS T.J., WEATHERS L.G. RORDORF G.F. and KEARNS D.R. 1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 63: 160-167.
- SEMANCIK, J.S., T.J. MONIS, L.G. WEATHERS, G.F. RORDORF and D.R. KEARNS. 1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology*. 63: 160-167.
- SEMANCIK J.S., SZYCHOWSKI J.A., RAKOWSKI G. and SYMONS R.H. 1993. Isolates of citrus exocortis viroid recovered by host and tissue selection. *Journal of General Virology*. 74: 2427-2536.
- SHLEMMER A., ROISTACHER C.N. and SEMANCIK J.S. 1985. A unique, infectious RNA which causes symptoms in citron typical of citrus exocortis disease. *Phytopathology*. 75: 946-949.
- VISVADER J.E., GOULD A.R., BRUENING G.E., SYMONS R.H. 1982. Citrus Exocortis Viroid: nucleotide sequence and secondary structure of an australian isolate. *FEBS Letters*. 137: 288-292.
- VISVADER, J.E. and SYMONS, R.H. 1983. Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. *Virology*. 130: 232-237.
- VISVADER, J.E. and SYMONS, R.H. 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequences with pathogenicity. *Nucleic Acid Research* 13: 2907-2920.
- WEATHERS, L.G., GREER, F.C., JR and HARJUNG, M. K. 1967. Transmission of exocortis virus of citrus to herbaceous plants. *Plant Disease Reporter*. 51: 868-871.