

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

UNIDAD DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE PLANTAS

**CARACTERIZACIÓN DE VIROIDES DE LOS CÍTRICOS Y GENES EXPRESADOS
DIFERENCIALMENTE EN CÍTRICOS SUSCEPTIBLES Y TOLERANTES
DURANTE LA INFECCIÓN POR *CITRUS CACHEXIA VIROID***

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS PRESENTA:

ALBERTO UC VÁRGUEZ

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

MÉRIDA YUCATÁN, MÉXICO
2008

DEDICATORIAS

A mi familia:

A mis padres, Celiano y Francisca, por sus enseñanzas y su ejemplo. Amá, especialmente a tí dedico este trabajo, porque tus sacrificios, tu apoyo y cariño me han permitido alcanzar esta meta.

A mis hermanos y sus respectivas familias: Valentin, Adolfo, Francisco, Sandy y Claudia por compartir momentos de especial importancia conmigo. Con y por ustedes se terminó este trabajo.

A mi esposa, Yumi E. Nakazawa, por ser mi impulso y motivación, por estar y ser parte de este sueño. Por nuestro bebido. Este trabajo es por ustedes, este logro es nuestro.

Nasza rasa nie zgnie
Tak d' ugo jak b'dzie jutrozenka
Tak d' ugo jak woda dawa' b'dzie 'ycie ludziom.

A la memoria de mi gente

CONTENIDO

RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE CUADROS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	7
Viroides de los cítricos en México: Problemática actual, avances y perspectivas	7
1.1. RESUMEN	8
1.2. ABSTRACT	8
1.3. INTRODUCCIÓN	9
1.4. Características generales de viroides	10
1.4.1. Localización y movimiento	12
1.4.2. Transmisión	13
1.5. Viroides de los cítricos	14
1.5.1. <i>Citrus exocortis viroid</i>	14
1.5.2. <i>Citrus viroid I</i>	16
1.5.3. Hop stunt viroid (<i>variante Citrus viroid II (CcaVd)</i>)	17
1.5.4. <i>Citrus viroid III</i>	18

1.5.5. <i>Citrus viroid IV</i>	19
1.5.6. Citrus viroid original sample (CVd-OS).	20
1.5.7. Citrus viroid 1-Low similarity sequence (CVd- ISS).	20
1.6. Diagnóstico de los viroides	22
1.7. Patogénesis	22
1.8. Manejo de la enfermedad	24
1.9. PERSPECTIVAS	25
1.10. LITERATURA CITADA	26
CAPÍTULO 2	37
Incidence and Molecular characterization of citrus viroids in Yucatan, Mexico	
2.1. ABSTRACT	38
2.2. INTRODUCTION	39
2.3. MATERIALS AND METHODS	40
2.3.1. Citrus plant collection	40
2.3.2. Nucleic acids extraction and viroid amplification	41
2.3.3. Cloning and Sequencing	43
2.3.4. Sequences analysis	43
2.3.5. Phylogenetic analysis of citrus viroid	44
2.4. RESULTS	44
2.4.1. Citrus exocortis viroid and Citrus cachexia viroid incidence	44
2.4.2. Molecular identification of Citrus viroids	46
2.4.3. Phylogenetic analysis of CcaVd	50

2.4.4. Secondary structure	52
2.5. DISCUSSION	52
2.6. ACKNOWLEDGMENTS	55
2.7. REFERENCES	56

CAPITULO 3 59

Molecular characterization of a population of Citrus Exocortis Viroid-Low sequence similarity (CEVd-LSS), a tentative new citrus viroid isolated in citrus species in Yucatan, Mexico

3.1. ABSTRACT	60
3.2. INTRODUCTION	60
3.3. MATERIALS AND METHODS	62
3.3.1. Molecular characterization	62
3.3.2. Viroid sources	62
3.3.3. Nucleic acids extraction and viroid amplification	62
3.3.4. Cloning and Sequencing	63
3.3.5. Sequence analysis	63
3.3.6. Phylogenetic analysis	63
3.3.7. Secondary structure	64
3.3.8. Plant inoculation	65
3.4. RESULTS	65
3.4.1. Molecular characterization	65
3.4.2. Secondary structure	69
3.4.3. CEVd-LSS symptomatology	71

3.4.4. Phylogenetic analysis	71
3.5. DISCUSSION	73
3.6. ACKNOWLEDGMENTS	76
3.7. REFERENCES	77
CAPITULO 4	81
Genes expresados diferencialmente en citricos susceptibles y tolerantes a Citrus cachexia viroid	
4.1. RESUMEN	81
4.2. INTRODUCCIÓN	82
4.3. REVISIÓN DE LITERATURA	83
4.3.1. Alteraciones en el nivel de proteínas y otros compuestos	83
4.3.2. Silenciamiento y alteraciones en la expresión de genes	85
4.4. MATERIALES Y METODOS	87
4.4.1. Preparación de material vegetal para Expresión diferencial	87
4.4.2. Identificación de genes	87
4.5. RESULTADOS	90
4.5.1. Preparación de material vegetal para Expresión diferencial	90
4.6. LITERATURA CITADA	93
4.7. DISCUSIÓN GENERAL	97
4.8. CONCLUSIONES GENERALES	99
4.9 PERSPECTIVAS	100

RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y bajo la asesoría del comité tutorial

integrado por la Dra. Genia López Rodríguez, Dra. Gertrudis Rodríguez del CICY y el Dr. Ricardo Bustamante del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato.

Este proyecto fue apoyado con recursos del PIFOP y mediante la beca de Doctorado del CONACYT 141670.

Las plantas utilizadas como modelo de estudio fueron donados por el MC. Ricardo Álvarez del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Tamaulipas, y el MC. Rafael Cetina del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Quintana Roo.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, por que sin su ayuda nada de esto hubiera sido posible.

Al pueblo de México, que a través del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología hizo posible la realización de mis estudios de Doctorado.

De manera muy especial agradezco al Dr. Oscar A. Moreno Valenzuela, por su amistad y su dirección en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a la Dra. Cecilia M. Rodríguez García, por la revisión minuciosa del documento y por su acertada orientación siempre con la finalidad de mejorar este trabajo.

Este documento se enriqueció de manera importante por las observaciones y sugerencias del Dr. Rafael Rivera Bustamante y Dra. Ema Zavaleta Mejía, Gracias.

A la Dra. Rosa María Escobedo Gracia Medrano, por su valioso apoyo con material bibliográfico y especialmente por sus consejos durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, Dr. Tomas González Estrada, Dr. Ignacio Islas Flores y Dr. Enrique Castaño por las facilidades otorgadas para uso de su equipo de laboratorio.

A la MC. Lucila Sánchez Cach, MC. Ramón Souza Perera y Yereni Minero, técnicos de la UBBMP, por su ayuda y múltiples consejos en el trabajo de laboratorio.

A todos los profesores de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, quienes de alguna manera contribuyeron en mi formación durante mi estancia en el CICY.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Inés, Cristina, Abelardo, Cecilia, Roberto, Chuy, Héctor, con quienes compartí y disfruté momentos inolvidables.

A todos los compañeros y amigos de la UBBMP, en especial a Gabriel, Fito, Juan, Hernán, Rubí, Julia, Roberto, Lupita, Karen, Jorge y Eliel por las pláticas, discusiones y momentos especiales que compartimos.

INDICE DE ABREVIATURAS

VTC	Virus tristeza de los cítricos
CVd-I	<i>Citrus viroid-I</i>
CVd-IV	<i>Citrus viroid-IV</i>
CVd-III	<i>Citrus viroid-III</i>
CEVd	<i>Citrus exocortis viroid</i>
CcaVd	<i>Citrus cachexia viroid</i>
FAO	Food agriculture organization
CVds	Citrus viroids
ARN	Ácido ribonucleico
PSTVd	<i>Potato spindle tuber viroid</i>
CBLVd	<i>Citrus bent leaf viroid</i>
HSVd	<i>Hop stunt viroid</i>
CVd-OS	<i>Citrus viroid</i> original sample
CVd-I LSS	<i>Citrus viroid I</i> low sequence similarity
CVd-V	<i>Citrus viroid-V</i>
ASSVd	<i>Apple scar skin viroid</i>
CVd-II	<i>Citrus viroid-II</i>
CCCVd	<i>Cadang-cadang coconut viroid</i>
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
ADN	Ácido desoxiribonucleico
CEVd-LSS	<i>Citrus exocortis viroid</i> low sequence similarity
ICTV	International committee taxonomy of virus
CCR	Central conserved region
TCR	Terminal conserved region
TCH	Terminal conserved hairpin

ÍNDICE DE FIGURAS

- 2.1.** Products of RT-PCR analysis visualized in 2% agarose gel obtained for 1. 45
Citrus exocortis viroid (375bp), 2.- *Citrus cachexia viroid* (300bp), 3.-
Citrus viroids 1 (329 bp), 4.- *Citrus viroids* IV.
- 2.2** Percentage of citrus tree infected by *Citrus cachexia viroid* and *Citrus* 45
exocortis viroid in seven commercial orchards of Yucatan Mexico.
- 2.3** Symptoms as yellowing (a), steam pitting (b), epinasty ©, and cracking (d) 47
observed in plants infected by HSVd variant isolates from Yucatan
Mexico.
- 2.4** Proposed secondary structure of minimum free energy of CcaVd Yuc and 49
CcaVd (760949). Conserved regions (CCR and TCH) in members of the
genus Pospiviroid are marked. The blue arrow points represent Terminal
conserved hairpin, and the red arrows points represent Central conserved
region.
- 2.5** Phylogenetic tree built with *Citrus cachexia viroid* sequences reported at 51
the Gen bank database and CcaVd Yuc sequences isolates in Yucatan
Mexico using the Winclada program version 1.00.08.
- 3.1** Nucleotide sequences alignment of the sixteen *Citrus exocortis viroid* low 67
sequence similarity (CEVd LSS) isolated from Yucatan, and two *Citrus*
exocortis viroid (CEVd-Egypt, AF298177, and CEVd 78, AY513268),
reported in NCBI database.
- 3.2** Proposed secondary structure of minimum free energy of CEVd 70
(AY671952) and CEVd-LSS (DQ318790). Conserved regions (CCR and
TCR) in members of the genus Pospiviroid are marked. The blue arrow
points represent Terminal conserved region, and the red arrows points
represent Central conserved region.
- 3.3** Sequence-inferred phylogenetic relationships of CEVd-LSS and CEVd; 72
the single most parsimonious tree is presented. Numbers above the
major nodes represent jackknife values > 70% (1000 iterations). CVd-II
(HX19945 accession number) was used as out-group.

ÍNDICE DE CUADROS

1.1	Variantes y principales síntomas inducidos por siete especies de CVds	21
2.1	Specific Oligonucleotides and amplification conditions used to amplify full length genome by RT-PCR of each Citrus viroids.	42
2.2	Number of the citrus tree found with two, three and four different citrus viroid and localities where them were found.	48
3.1	Accession number, size and identity percentage of the five <i>Citrus exocortis viroid</i> low sequence similarity (CEVd LSS) compared with four <i>Citrus exocortis viroid</i> sequences reported in NCBI database.	66
3.2	Nucleotide composition of <i>Citrus exocortis viroid</i> low sequence similarity (CEVd LSS) sequences compared among two <i>Citrus exocortis viroid</i> (CEVd) sequences reported in NCBI database.	66
3.3	Potential polypeptide translation products of <i>Citrus exocortis viroid</i> Low sequence similarity (CEVd-LSS), positions of start and stop codons and length of products.	69
4.1	Condiciones de amplificación utilizados en la prueba de expresión diferencial.	88
4.2	Número de bandas amplificadas con expresión diferencial en cada uno de los tratamientos en Lima rangpur.	90
4.3	Número de bandas amplificadas con expresión diferencial en cada uno de los tratamientos en Naranja agrio.	92

RESUMEN

México, ocupa el cuarto lugar en la producción de cítricos a nivel mundial con una superficie de 523,503 has y es uno de los cultivos más importantes para el país debido al número de productores dedicados a esta actividad y a la cantidad de jornales generadas en todos los procesos de producción, empaque y comercialización. Sin embargo, la detección del Virus de la tristeza de los cítricos (VTC) en varias regiones del país provocó el cambio del portainjerto naranjo agrio altamente susceptible al VTC por portainjertos tolerantes a este virus. Sin embargo, los nuevos portainjertos se comportan como susceptibles a otros patógenos como los viroides de los cítricos. En este trabajo analizamos de manera crítica la problemática de los viroides de los cítricos y discutimos las perspectivas para México con base a la información generada hasta el momento. Por otro lado, determinamos la presencia de CVd-I, CVd-IV, CVd-III así como la incidencia y distribución de CEVd y CcaVd, como los dos viroides más importantes en Yucatán México. Proporcionamos evidencia firme que sugiere la presencia de un nuevo viroide de los cítricos en Yucatán, el cual nombramos tentativamente como *Citrus exocortis viroid low sequence similarity*. Por último, en un intento por determinar las causas a nivel molecular del comportamiento diferencial del naranjo agrio (tolerante) y de la lima rangpur (susceptible) durante la infección por el viroide *Citrus cachexia viroid* aislamos 125 clonas con expresión diferencial. Además se continúa trabajando para confirmar la expresión diferencial de estas clonas.

ABSTRACT

Mexico is in the fourth place of citrus production in the world with 523, 503 ha, it is also one of the most important crops in Mexico because of the number of people involved in citrus production, packing and commercialization. The detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) in different states of Mexico caused the use of another rootstock than sour orange which is susceptible to CTV, but the new rootstocks which are tolerant to CTV are susceptible to other pathogens like viroids. In this work we analyzed the citrus viroid problem and we also discuss about the perspectives in Mexico, using the generated information until now. On the other hand, we determined the presence of CVd-I, CVd-IV, CVd-III, as well as the incidence and distribution of CEVd y CcaVd, the most important viroids in Yucatan, Mexico. We also show evidence suggesting the presence of a new citrus viroid in Yucatan, named Citrus exocortis viroid low sequence similarity. Finally, in order to determine the differential behaviour of sour orange (tolerant) and rangpur lime (susceptible) during the infection by Citrus cachexia viroid, we isolated 125 bands that were differentially expressed.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el cuarto lugar en la producción de cítricos en el mundo, con una superficie sembrada de 523 505 ha y un volumen de producción equivalente a 6 475 411 toneladas métricas (FAO, 2005. <http://www.fao.org>). Los principales cítricos cultivados en México son naranja dulce, limón, toronja y mandarina, de los cuales aproximadamente el 70% utiliza al naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) como portainjerto, debido a su vigor, productividad y tolerancia a enfermedades fungosas y a viroides; sin embargo, es altamente susceptible a la tristeza de los cítricos, cuyo agente causal es el *Citrus tristeza virus* (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992).

La detección en México del CTV en 1983, así como la diseminación del vector más importante de la enfermedad, el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Kirkaldy), en el Sureste Mexicano (Villareal, 2001), provocó la adopción como estrategia del manejo de la enfermedad, el cambio de portainjertos (3000 ha/año) susceptibles por tolerantes al CTV (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992). El naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y sus híbridos, los citranjes troyer y carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck + *Poncirus trifoliata*), son los portainjertos más utilizados como sustitutos del naranjo agrio, sin embargo, estos portainjertos presentan la desventaja de ser susceptibles a los viroides *Citrus cachexia viroid* (CcaVd) y *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Roistacher, 1995), cuya incidencia en algunas regiones del país son 50-60%. En el mundo se conocen cinco especies de viroides de los cítricos y tres nuevas especies han sido propuestas, sin embargo, su presencia en México no se ha determinado, a excepción del CEVd y del CcaVd. Debido a lo planteado anteriormente, en México, las pérdidas por los CVds pueden ser superiores a las generadas por el CTV, tal como ocurrió en Venezuela y Belice (Ochoa *et al.*, 1994). De esta manera resulta importante determinar la incidencia y distribución de estos patógenos, así como determinar la presencia de otras especies de viroides en las plantaciones de cítricos del país.

Los viroides son patógenos compuestos de ARN de cadena sencilla de bajo peso molecular, con un tamaño entre 246-475 nucleótidos (nt), sin cubierta proteica, cerrados covalentemente con una estructura secundaria circular que les permite adoptar configuraciones de doble cadena (Diener, 1987; Sano *et al.*, 1992). No son transcritos a ARNm y poseen una alta proporción de G:C (cerca del 76%) y su replicación ocurre por el mecanismo del círculo rodante (Daròs *et al.*, 1994).

Un modelo propuesto de la estructura secundaria de los viroides de la familia *Pospiviroidae* sugiere la presencia de cinco dominios estructurales: el dominio Central (C), el Variable (V), el de Patogenicidad (P), el Terminal izquierdo (TL) y el Terminal derecho (TR) (Keese y Symons, 1985). Cada uno de estos dominios posee regiones altamente conservadas que han sido utilizados para clasificar la familia en subgrupos (Flores *et al.*, 1998).

Las alteraciones morfológicas y citológicas que provocan los viroides han sido descritas hace ya varios años (Moreschet *et al.*, 1998; El Shafy *et al.*, 1971). Por otro lado, algunos reportes de las alteraciones moleculares que inducen los viroides son la acumulación diferencial de proteínas PR (proteínas relacionadas con la patogenicidad) y ARNm en plantas infectadas, además de otros compuestos, como ácido gentísico en tomate (*Solanum lycopersicom*) (Belles *et al.*, 1999), proteínas tipo osmotina (proteína PR ubicada dentro del grupo PR-5) en tomate y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Medrano *et al.*, 1992) y disminución del nivel de putrescina libre en tomate y *Gynura aurantiaca* (Belles *et al.*, 1991; Belles *et al.*, 1993).

Se ha determinado que algunos viroides inducen una disminución en el nivel de transcritos del gen que codifica para la giberelina oxidasa 20 (Vidal *et al.*, 2003), incremento en la expresión del gen de una proteína cinasa (Hammond y Zhao, 2000) y varios genes PR en tomate (Itaya *et al.*, 2002). Finalmente Wang y colaboradores (2004) sugieren que el mecanismo de patogenicidad de los viroides es vía silenciamiento postranscripcional de genes de importancia para la planta, lo cual podría explicar las alteraciones mencionadas anteriormente.

Considerando las evidencias citadas anteriormente, resulta importante analizar el patrón de expresión de genes en plantas susceptibles y tolerantes durante la

infección viroides. Los objetivos de este trabajo fueron: 1.- Determinar la incidencia y distribución de los viroides de la Cachexia y la Exocortis de los cítricos en el estado de Yucatán, México. 2.- Identificar y caracterizar molecularmente las especies de viroides de los cítricos presentes en el Estado. 3.- Identificar los genes expresados diferencialmente en especies tolerantes (naranja agrio) y susceptibles (lima rangpur) en respuesta a la infección por *Citrus cachexia viroid*.

REFERENCIAS

- Belles, J. M., Carbonell, J. and Conejero, V. 1991. Polyamines and plants infected by *Citrus exocortis* viroid or treated with silver ions and ethephon. *Plant Physiology* 96: 1053- 1059.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., and Conejero V. 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 227-235.
- Bellés, J. M., Pérez-Amador, M. A., Carbonell, J., and Conejero V. 1993. Correlation between ornithine descarboxylase and putrescine in tomato plants infected by *Citrus exocortis* viroid or treated with ethephon. *Plant Physiology* 102:933-937.
- Daròs, J. A., Marcos, J. F., Hernández, C., and Flores, R. 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91:12813-12817.
- Diener, T. O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, New York. USA. 344 p.
- El-Shafy, A., Calavan, E. C. and Desgardins, P. R. 1971. Comparative anatomy of healthy and exocortis virus infected citron plants. *Phytopathology* 61: 990-993.

- FAO, 2005. Estadísticas Agrícolas de la Organización Mundial para la agricultura y la alimentación (FAO, por sus siglas en ingles). <http://www.fao.org>
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., and Diener, T. O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. Archives of Virology 143:623-630.
- Hammond, R. W., and Zhao, Y. 2000. Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by *Potato spindle tuber viroid*. Molecular Plant Microbe Interactions 13: 903-910.
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R. A., Nelson, R. S. and Ding, B. 2002. Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. Molecular Plant Microbe Interactions 15(10): 990-999.
- Keese, P., and Symons, H. R. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 82: 4582-4586.
- Medrano, R. R., Moraila, J. B., Estrella, H. L. and Bustamante R, R. 1992. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. Plant Molecular biology 20: 1199-1202.
- Moreshet, S., Cohen, S., Azor, Z. and Bar, J. M. 1998. Water relations of citrus exocortis viroid infected grapefruit trees in the field. Journal Experimental of Botany 49 (325): 1421-1430.
- Ochoa, C. F. M., Rocha-Peña. M. A., y Lee, R. F. 1994. Impacto del virus de la tristeza en la citricultura venezolana: cronología de eventos. Revista Mexicana de Fitopatología 12: 97-105.
- Rocha-Peña, M. A., y Padrón-Chávez, J. E. 1992. Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza. Publicación especial No.2. Campo Experimental General Terán. INIFAP. México 48 p.
- Roistacher, C. N. 1995. Graft transmissible diseases of citrus handbook for detection and diagnosis. FAO. Roma, Italy. 286 p.

- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R. W., Diener, T. O., and Owens, R. A. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 10104-10108.
- Vidal, A. M., Cheikh, W. B., Talon, M. and Martinez, G. J. L. 2003. Regulation of giberellin 20 oxidase gen expression and giberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 217: 442-448.
- Villareal, G. L. A. 2001. Antecedentes y situación de la tristeza de los cítricos en México. *Memorias del Simposio Internacional Virus tristeza de los cítricos*. CD. Victoria Tamaulipas, México.
- Wang, M-B., Bian, X-Y., Wu, L-M., Liu, L-X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R-M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., and Waterhouse, P. M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 3275-3280.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

Viroides de los cítricos en México: Problemática actual, avances y perspectivas*

¹Alberto Uc-Vázquez., ²Cecilia Mónica Rodríguez-García y ¹Oscar Alberto Moreno-Valenzuela

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán. México. ucalbert@cicy.mx; oamv@cicy.mx.

²Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Col. Chuburná de Hidalgo, CP 97200, Mérida, Yucatán. México. covi@cicy.mx

*Este capítulo fue enviado para su publicación a la revista Mexicana de Fitopatología.

1.1. RESUMEN

En México, se ha reportado la presencia e incidencia de todas las especies de viroides de los cítricos, pero su importancia no ha sido valorada, debido a que los efectos de estos patógenos no son observables en el patrón naranjo agrio (*Citrus aurantium*), utilizado en el 70% de las plantaciones citrícolas. Por otro lado, la detección del *Citrus tristeza virus* ha provocado el cambio del naranjo agrio por portainjertos tolerantes a *Citrus tristeza virus*. Estos nuevos portainjertos son susceptibles a viroides de los cítricos, lo cual podría provocar en el futuro problemas fitopatológicos en las zonas citrícolas. Un análisis minucioso de los antecedentes de los viroides de los cítricos, de los avances en su manejo y de los reportes sobre la interacción planta-patógeno es plasmado en este artículo.

Palabras clave: *Citrus viroid*, citricultura, *Citrus tristeza virus*

1.2. ABSTRACT

Presence and incidence of several citrus viroids has been reported in Mexico. These viroids' significance has not been valued because their effect is not apparent in sour orange *Citrus aurantium*, which accounts for 70% of cultivated citrus. Detection of *Citrus tristeza virus* has lead to a transition from sour orange to *Citrus tristeza virus*-resistant rootstock. This new rootstock is susceptible to citrus viroids and could cause further phytopathological problems in Mexican citriculture. A detailed analysis is presented of citrus viroids research, advances in viroids management and reports on plant-pathogen interactions.

keywords: *Citrus viroid*, citriculture, *Citrus tristeza virus*

1.3. INTRODUCCIÓN

México ocupa el cuarto lugar en la producción de cítricos en el mundo, con una superficie sembrada de 523 505 ha y un volumen de producción equivalente a 6 475 411 toneladas métricas (FAO, 2005. <http://www.fao.org>). Aproximadamente, el 70% de la superficie cítrica del país utiliza al naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.) como portainjerto, debido a su vigor, productividad y tolerancia a enfermedades fungosas y a viroides; sin embargo, es altamente susceptible a la tristeza de los cítricos cuyo agente causal es el *Citrus tristeza virus* (CTV), el cual ha provocado la muerte de millones de árboles en el mundo (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992).

La detección en México del CTV en 1983, así como la diseminación del vector más importante de la enfermedad, el pulgón café de los cítricos (*Toxoptera citricida*) (Kirkaldy), en la Península de Yucatán y demás estados del sureste Mexicano (Villareal, 2001), provocó la adopción como estrategia del manejo de la enfermedad, el cambio de portainjertos susceptibles por tolerantes al CTV (Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992). El naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) y sus híbridos, los citranjes troyer y carrizo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck + *Poncirus trifoliata*) son los portainjertos más utilizados como sustitutos del naranjo agrio, sin embargo, estos portainjertos presentan la desventaja de ser susceptibles a los viroides *Citrus cachexia viroid* (CcaVd) y *Citrus exocortis viroid* (CEVd) (Roistacher, 1995).

Los viroides de los cítricos (CVds) son un grupo de patógenos a los cuales no se les ha considerado en México como un problema fitosanitario de los cítricos, a pesar de que en varias regiones se han detectado incidencias superiores al 60% de árboles infectados por CcaVd y CEVd (Alvarado, 1998; Uc-Vázquez *et al.*, 2005). A la fecha no se han reportado pérdidas económicas importantes en cítricos debido a CVds, lo cual puede deberse a que el naranjo agrio, el portainjerto más utilizado en México es resistente a CVds. Por lo que trabajos dirigidos a determinar el efecto de estos patógenos en las plantaciones serán fundamentales.

Las incidencias del CTV detectados en algunos de los huertos con mayor número de árboles positivos fueron de 4.34% y 0.70%; (Silva-Vara *et al.*, 2001) en los cuales no se reportó la muerte de árboles causada por este virus. Recientemente se han reportado algunos de los efectos de los viroides de los cítricos en Yucatán, México (Jasso, 2005). Considerando que la superficie sembrada con portainjertos susceptibles a viroides ha incrementado en superficie (3000 ha/año), las pérdidas pueden ser superiores a las generadas por el CTV, tal como ocurrió en Venezuela y Belice (Ochoa *et al.*, 1994).

En Yucatán México, Uc y colaboradores (2005), identificaron la presencia de varias especies de viroides de los cítricos reportadas en la literatura. Esto, aunado a las altas incidencias de CEVd y CcaVd, al incremento de plantaciones con portainjertos susceptibles a CVds, así como a las alteraciones ocasionadas por CEVd y CcaVd y a la mezcla de especies de viroides en un mismo árbol, sugiere que el riesgo potencial que representan estos patógenos debe evaluarse, ya que podrían provocar efectos desastrosos en la citricultura mexicana. En esta revisión se analiza; la problemática de estos patógenos y se discuten los recientes avances en la interacción planta-patógeno.

1.4. Características generales de viroides

Hasta la fecha, se han publicado varios artículos de revisión sobre generalidades de los viroides (Tabler y Tsagris, 2004; Flores *et al.*, 2005), posible origen (Chela-Flores, 1994) y su transmisión por semilla (Mink, 1993). Sin embargo, ninguna ha sido enfocada al grupo de viroides que infectan a los cítricos.

Los viroides son patógenos compuestos de ARN de cadena sencilla de bajo peso molecular, con un tamaño entre 246-475 nucleótidos (nt), sin cubierta proteica, cerrados covalentemente con una estructura secundaria circular que les permite adoptar configuraciones de doble cadena (Diener, 1987; Sano *et al.*, 1992). No son

transcritos a ARNm y poseen una alta proporción de G:C (cerca del 76%), su replicación ocurre por el mecanismo del círculo rodante (Daròs *et al.*, 1994).

Un modelo propuesto de la estructura secundaria de los viroides de la familia *Pospiviroidae* sugiere la presencia de cinco dominios estructurales: el dominio Central (C), el Variable (V), el de Patogenicidad (P), el Terminal izquierdo (TL) y el Terminal derecho (TR) (Keese y Symons, 1985). Cada uno de estos dominios posee regiones altamente conservadas: a) la Región central conservada (CCR), localizada dentro del dominio Central, b) la Región terminal conservada (TCR), localizada en la cadena superior del dominio TL, la cual posee una secuencia conservada y se ha encontrado solamente en los viroides con un tamaño superior a 300 pb, c) la Horquilla terminal conservada (TCH), localizada en el dominio TL, la cual al parecer, es el sitio de inicio de replicación de los viroides (Kolonko *et al.*, 2005). También se han identificado en la región Terminal izquierda las regiones llamadas Horquilla I y Horquilla II, involucradas en el inicio de la replicación y en la infección respectivamente (Kolonko *et al.*, 2005; Candresse *et al.*, 2001).

Se han identificado 30 especies de viroides en diferentes especies de plantas. Con base en su localización celular y en la presencia o ausencia de actividad tipo ribozima, estos patógenos se han clasificado en dos familias: *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, localizados en el núcleo o en los nucléolos y en los cloroplastos respectivamente (Bonfiglioli *et al.*, 1994). Las especies de viroides de los cítricos identificados se agrupan en cuatro subgrupos de la familia *Pospiviroidae*: *Pospiviroid*, *Apscaviroid*, *Hostuviroid* y *Cocadviroid* (Ito *et al.*, 2000; Flores *et al.*, 2005).

1.4.1. Localización y Movimiento. La infección sistémica del hospedante por viroides de la familia *Pospiviroidae* requiere el movimiento del viroide dentro del hospedante, lo cual implica, importe al núcleo, exporte fuera del núcleo, movimiento célula-célula, entrada al sistema vascular, movimiento a larga distancia dentro del sistema vascular y finalmente salida del sistema vascular (Zhu *et al.*, 2001).

El movimiento de los viroides de célula a célula en la planta hospedante, ocurre por la vía de los plasmodesmos y esta mediado por una secuencia específica o motivo estructural del patógeno (Ding *et al.*, 1999). Algunos estudios en *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) sugieren la existencia de una secuencia señal, la cual consiste en una región y/o motivo estructural responsable del importe nuclear, regulada por un receptor saturable específico (Woo *et al.*, 1999). Esta regulación del movimiento subnuclear del viroide fue confirmado después de determinar una localización diferencial subnuclear de las cadenas de PSTVd dependiendo de su polaridad, ya que la cadena PSTVd (+) se localiza tanto en el nucleoplasma como en el nucléolo, mientras que la cadena PSTVd (-) se encontró únicamente en el nucleoplasma (Qi y Ding, 2003a y 2003b). Sin embargo, se desconoce si la cadena de PSTVd (+) se procesa en el nucléolo o si la cadena multimérica se procesa en el nucleoplasma.

El movimiento a larga distancia ocurre a través del floema (Zhu *et al.*, 2001), mediado por la interacción de determinadas regiones del viroide con alguna proteína del hospedante y no en forma de ARN libre (Owens *et al.*, 2001). Esto se demuestra por la interacción específica identificada entre la proteína VirP1 del tomate y el dominio TR del PSTVd, en el cual se involucra una secuencia de 71 nucleótidos (Gozmanova *et al.*, 2003; Maniataki *et al.*, 2003). Para este viroide se ha descrito que el movimiento dentro de los tubos cribosos del floema ocurre en el interior de órganos selectivos, en una interacción con secuencias específicas del viroide (Zhu *et al.*, 2001). Por otra parte, se ha observado en pepino (*Cucumis sativum* L.) infectado con el PSTVd la formación de un complejo entre ARN del viroide mas una proteína dimérica del floema denominada lectina 2 (Gómez y Pallás, 2001). Las

evidencias sugieren que la lectina 2 del floema sola o en unión con otras proteínas, facilita el movimiento de larga distancia del viroide (Owens *et al.*, 2001).

Se ha sugerido que la dirección del movimiento del CEVd, en plantas de cidra es en forma basipétala y puede encontrarse en toda la planta a los 60 días después de la inoculación (Gafny *et al.*, 1995). Sin embargo, el PSTV se mueve de los brotes hacia las raíces y se encuentra en toda la planta a los 11 días después de la infección (Palukaitis, 1987). Por otro lado, se ha observado una variación en la distribución del CEVd en la planta, ya que árboles injertados con yemas tomadas del lado noroeste de árboles enfermos permanecen sanos, mientras que árboles injertados con yemas muertas tomadas del lado suroeste desarrollan síntomas (Pujol, 1965). Esta información tiene aplicaciones prácticas, sin embargo, no existen evidencias moleculares que apoyen lo anterior.

1.4.2. Transmisión. Numerosos trabajos demuestran que dentro de una plantación, los viroides de los cítricos se transmiten en forma mecánica, de planta a planta, por herramientas de poda y otros utensilios cortantes contaminados (Skaria *et al.*, 1994; Barbosa *et al.*, 2005; Semancik y Vidalakis., 2005) y a larga distancia mediante injerto (Mendonca *et al.*, 1977; Barbosa *et al.*, 2005). Weathers y colaboradores (1967), demostraron que el CEVd se transmite por *Cuscuta* sp. de cítrico a cítrico y a 12 especies pertenecientes a los géneros *Petunia*, *Solanum* y *Physalis*. Se ha observado que la savia cruda y el ARN proveniente de cidra etrog transmiten al CEVd con una eficiencia del 30 y 100 %, respectivamente (Skaria *et al.*, 1994). Por otro lado, bajo condiciones de campo y dependiendo del cultivar, se han encontrado porcentajes del 4 al 21% de transmisión mecánica de CEVd, CBLVd, HSVd y CVd-III (Barbosa *et al.*, 2005). Algunos autores sugieren que el CEVd puede transmitirse por semilla (Salibe y Moreira, 1965), lo cual no ha sido confirmado (Mendonca *et al.*, 1977). En el caso de algunas variantes del *Hop stunt viroid* y *grapevine yellow speckle viroid* I se ha demostrado que puede transmitirse por semilla en ocho variedades de vid, sin embargo, se detectó una baja concentración de los viroides en las plántulas (Wan Chow Wah y Symons, 1999). Considerando que el *Citrus*

cachexia viroid es una variante del *Hop stunt viroid* y que este se transmite por semilla entonces es posible que el CcaVd pueda transmitirse por semilla, aunque no se han realizado trabajos dirigidos a demostrar este tipo de transmisión.

1.5. Viroides de los cítricos

Se han reportado cinco especies de viroides de los cítricos: *Citrus exocortis viroid* (Diener, 1987), *Citrus bent leaf viroid* formalmente llamado CVd-Ib (Ashulin *et al.*, 1991; Hataya *et al.*, 1998), *Hop stunt viroid* siendo su variante *Citrus cachexia viroid* el que afecta a los cítricos (Diener, 1987; Reanwarakorn y Semancik, 1999; Amari *et al.*, 2001), *Citrus viroid -III* (CVd-III) (Rakowski *et al.*, 1994; Owens *et al.*, 2000), *Citrus viroid IV* (CVd-IV) (Puchta *et al.*, 1991) además se han propuesto a *Citrus viroid* muestra original (CVd-OS) (Ito *et al.*, 2001), *Citrus viroid* secuencia de baja similitud (CVd-I-LSS) y *Citrus viroid V* como especies nuevas de viroides que infectan a los cítricos (Ito *et al.*, 2000; Serra *et al.*, 2008). Los síntomas de las variantes principales de cada CVd se presentan en el cuadro 1.1. Una descripción detallada de cada uno de los viroides de los cítricos se presenta a continuación:

1.5.1. *Citrus exocortis viroid*. Es el agente causal de la exocortis de los cítricos, enfermedad ampliamente distribuida en las plantaciones de cítricos a nivel mundial (Verhoven *et al.*, 1994; Elleuch *et al.*, 2003). En México se encontró una incidencia del 50 % de árboles cítricos afectados en Veracruz, Nuevo León, Sinaloa, Tabasco y Yucatán (Alvarado, 1998; Uc-Vázquez *et al.*, 2005). Se han encontrado Variantes del CEVd infectando naturalmente plantas de tomate (*Solanum esculentum*), nabo (*Brassica napus* L.), zanahoria (*Daucus carota* L.) y berenjena (*Solanum melongena* L.) (Mishra *et al.*, 1991; Fagoaga y Durán-Vila, 1996; Verhoeven *et al.*, 2004). El efecto de este viroide en tomate es una proliferación apical, enanismo, epinastia, distorsión foliar y necrosis de la nervadura de las hojas (Mishra *et al.*, 1991; Verhoeven *et al.*, 2004). En otras hortalizas no se ha determinado el efecto de este viroide, sin embargo, su detección bajo condiciones naturales sugiere que la

producción de hortalizas en países productores incluyendo México pueden ser afectados, por lo que, la valoración de sus efectos bajo condiciones naturales debe realizarse. El CEVd consiste en una molécula infecciosa de ARN con 371 nt de longitud, aunque se han encontrado variantes cuyo tamaño es variable (Semancik *et al.*, 1994; Szychowski *et al.*, 2005), incluyendo una secuencia de 463 nt (Semancik *et al.*, 1994).

El ARN del CEVd puede permanecer infeccioso por largos períodos de tiempo en tejido seco o como contaminante en superficies de herramientas de poda (Barbosa *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha reportado la existencia de un gran número de variantes del CEVd que se diferencian en el grado de enanismo que causan y en la cantidad de escamación que ocasionan (Broadbent *et al.*, 1971; Visvader y Symons, 1983, 1985; Mishra *et al.*, 1991; Skoric *et al.*, 2001).

El descortezamiento del tallo se ha considerado como un síntoma característico y específico del CEVd, sin embargo, se han encontrado cítricos con este síntoma que no contienen CEVd pero si una mezcla de CVds (Ito *et al.*, 2002b). Lo anterior evidencia la posibilidad de que existan otras especies de viroides de los cítricos, en regiones en las cuales el diagnóstico se ha basado únicamente en el uso de plantas indicadoras o en el diagnóstico molecular dirigido casi exclusivamente a CEVd y CcaVd.

Las variedades de cítricos susceptibles a CEVd, como el naranjo navel injertados sobre citranges y sobre naranjo trifoliado reducen su cobertura en 55 y 68 % y su producción en 49 y 65 %, respectivamente (Verniere *et al.*, 2004; Jasso, 2005). También se ha observado una reducción en la circunferencia del tronco, 10 centímetros por arriba de la unión injerto – portainjerto (Verniere *et al.*, 2004). La variación en la expresión de síntomas de plantas inoculadas con variantes ligeras o severas es independiente de la concentración del CEVd en la planta hospedante, por lo que las diferencias en patogenicidad podrían estar directamente correlacionadas con los cambios en la secuencia de nucleótidos de las variantes (Visvader y Symons, 1985). Sin embargo, Skoric y colaboradores (2001), encontraron una variante severa (CEVd-S) y una variante intermedia (CEVd-M) de

CEVd, que difieren solamente en 5 nucleótidos en el dominio patogénico. En plantas de *Gynura aurantiaca* D.C se observó que la variante severa indujo síntomas altamente severos, en un amplio rango de condiciones ambientales. Sin embargo, la variante intermedia varió su expresión sintomatológica, la cual fue desde una ausencia de síntomas (bajo condiciones ambientales) hasta una reacción severa cuando dichas plantas se sometieron a temperaturas de 40 °C (Skoric *et al.*, 2001). Los resultados anteriores sugieren que la variación en la respuesta del hospedante, inducida por estas variantes podría no estar correlacionada con algún cambio en la secuencia o la conformación de la variante dominante del viroide, sino más bien, con las condiciones ambientales. Sin embargo, en este caso los autores no determinaron la concentración del viroide en los tejidos infectados, cuya acumulación pudo haber sido afectada (Serra *et al.*, 2008), ya que las condiciones ambientales, las características del hospedante y las características del patógeno son factores que influyen en la inducción de la enfermedad y en la aparición de síntomas (Campbell y Madden, 1990).

Los árboles infectados con el CEVd poseen 80 % de semillas estériles (Bitters *et al.*, 1987). Lo anterior posiblemente es el motivo por el que no se ha podido demostrar la transmisión por semilla de este viroide (Salibe y Moreira, 1965; Mendonca *et al.*, 1977).

1.5.2. *Citrus viroid* I. Este viroide es el primer miembro del subgrupo ASSVd que infecta a los cítricos, fue detectado por primera vez en aguacate y se ha encontrado además en naranjo dulce, naranjo agrio, limón, toronja y lima (Ashulin *et al.*, 1991; Uc-Vázquez *et al.*, 2005).

Se han descrito dos variantes del *Citrus viroid* I: *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd ó CVd-Ib) y *Citrus viroid* Ia (Hataya *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el CBLVd es un viroide quimérico constituido de una parte de la CCR del *Apple scar skin viroid* (ASSVd) y parte del dominio P y TL del CEVd (Gandía y Duran-Vila, 2004). Las diferencias entre CVd-Ia (328 nt) y CVd-Ib (318 nt), se encuentran en el dominio P y en la estructura secundaria tipo varilla de la TR, en la cual en el CVd-Ia

hay dos inserciones de 5 nt en la cadena superior e inferior de esta región terminal, comparado con CVd-Ib. Los dos aislados CVd-Ia y CVd-Ib tienen una identidad de secuencias del 94% (Hataya *et al.*, 1998).

La estructura de la horquilla terminal derecho de dos variantes del CVd-Ia son equivalentes a los del CVd-Ib, lo cual sugiere que la infectividad de este viroide en las dos variantes no es alterada (Hataya *et al.*, 1998), debido a que alteraciones en esta región afectan la capacidad de infección y el movimiento de célula a célula o de larga distancia de los viroides (Hammond, 1994). Estos rearrreglos observados en la TR así como en otros viroides como en el CEVd-92, en la cual 92 nt duplicados se localizan en los dominios V y TR (Semancik *et al.*, 1994), indican que el dominio TR es una región en la cual los rearrreglos intramoleculares pueden ocurrir (Keese y Symons, 1985). Por otro lado Foissac y Duran-Vila (2000), reportaron que la mayor variación entre secuencias de CVd-Ia es en el dominio Terminal izquierdo, por lo que también debería considerarse como una región variable.

1.5.3. Hop stunt viroid (variante Citrus viroid II (CcaVd). Es el agente causal de la Cachexia o xiloporosis de los cítricos. Esta enfermedad afecta a la mayoría de los cítricos, aunque algunas especies reaccionan en forma asintomática (Childs, 1950; Rocha-Peña y Padrón-Chávez, 1992). En México esta enfermedad se ha detectado en lima persa, en naranjo dulce y en toronja, en los estados de Tamaulipas, Veracruz, Tabasco y Yucatán (Alvarado, 1998; Uc-Vázquez *et al.*, 2005).

El *Citrus cachexia viroid* (CcaVd) posee un ARN circular de alrededor de 300 nt de longitud y presenta homología del 95% con el *Hop stunt viroid* (HSVd) (Sano *et al.*, 1988; Semancik *et al.*, 1988). Se conocen variantes de este viroide que inducen cachexia (CVd-IIb y CVd-IIc) y los que no inducen síntomas de cachexia (CVd-IIa) sobre mandarina pearson (Reanwarakorn y Semancik, 1999).

El CVd-IIa (302 nt) difiere del HSVd únicamente en dos nucleótidos, mientras que CVd-IIb y CVd-IIc, difieren en el tamaño entre 295 a 299 nt. CVd-IIa (302 nt) y CVd-IIb (299 nt), comparten una identidad de secuencias de 95.6% y

difieren en un agregado de 8 cambios localizados en la región que rodea el dominio C y el dominio V (Reanwarakorn y Semancik, 1998).

La mayor diferencia entre las variantes que inducen y los que no inducen caquexia es un agregado de 6 cambios de nucleótidos en el dominio V y una simple delección en el dominio TR. Esta modificación parece ser la clave para la inducción de caquexia, sin embargo, una variante que provocó síntomas intermedios de caquexia posee poca homología en esta zona de 6 nucleótidos, lo cual sugiere que este agregado no es el único factor involucrado en la inducción de cachexia (Reanwarakorn y Semancik, 1999, Vidalakis *et al.*, 2005).

Los síntomas que se observan en plantas con cachexia bajo condiciones de campo se describen en el Cuadro 1.1. *In vitro*, el CcaVd disminuye significativamente la formación de callos primarios con relación a los explantes libres de patógenos, además, la generación de yemas y brotes a partir de estos callos es significativamente menor (Duran-Vila *et al.*, 1991).

1.5.4. *Citrus viroid III*. Este viroide fue identificado por primera vez en plantas de cidra (*Citrus medica* L) y ha sido descrito en forma incompleta, debido tal vez a su rango de hospedantes exclusivo a cítricos (Rakowski *et al.*, 1994). Se han identificado cuatro diferentes aislados de este viroide (Cuadro 1.1.) (Duran-Vila *et al.*, 1988; Rakowski *et al.*, 1994; Stasys *et al.*, 1995).

Owens y colaboradores (2000), identificaron 20 secuencias del CVd-III, las cuales varían en su estructura secundaria con relación a CVd-IIIb en 4 diferentes porciones (una localizada en la horquilla terminal izquierdo, una en la porción superior del dominio P y dos porciones en la región inferior del dominio central conservada). Otros autores encontraron que las variantes de CVd-IIIa y de CVd-IIIb poseen una secuencia de 297 y 294 pb respectivamente, con una identidad del 96%, mientras que con viroides de otras especies comparten una identidad del 55%. Por otra parte, estos dos subgrupos de viroides, aunque poseen una secuencia mucho menor que los viroides del género Apscaviroid, poseen una región central

conservada, como en la mayoría de los viroides de este genero (Rakowski *et al.*, 1994).

Los síntomas que presentan las plantas infectadas por el CVd-III se describen en el Cuadro 1.1. Asimismo se ha observado que CVd-III reduce en un 26% el tamaño de los árboles de naranjo valencia delta/citrango yuma, sin afectar el volumen de la producción, (Van Vuuren y Da Graca, 1996a y b). Lo anterior sugiere que la infección con esta variante de CVd-III podría hacer más eficiente y rentable la producción de cítricos, al disminuir los costos de producción durante la cosecha sin afectar el volumen de producción. Por otra parte, Verniere y colaboradores (2004), demostraron que el CVd-III reduce considerablemente el volumen y la calidad de la producción, aunque no induce síntomas específicos en el naranjo trifoliado. En este estudio no se reportó la variante del CVd-III utilizada.

1.5.5. *Citrus viroid IV.* Es un viroide quimérico que consiste de 284 nt arreglados en una estructura tipo varilla, con una alta identidad de nucleótidos con el CEVd en el lado derecho de su región central y su región terminal similar al HSVd, ubicándose como miembro del subgrupo *Cocadviroid* (Puchta *et al.*, 1991). Sin embargo, Semancik y Vidalakis (2005), sugieren que CVd-IV debería considerarse como un miembro del subgrupo *Pospiviroid*, ya que la secuencia de nucleótidos de este viroide presenta vestigios de una TCR con un 56% de identidad con la región terminal conservada y su región terminal repetida (TRR) posee un 63% de identidad con la del CEVd respectivamente. Por otra parte, el CEVd posee un 80% de homología con la TCH de *Hostunviroid* y *Cocadviroid*. El análisis de la secuencia completa de CVd-IV demuestra que este viroide posee 76.4 % de homología con el CEVd y 68% con CCCVd (miembro tipo del subgrupo *Cocadviroid*). Por último, las evidencias biológicas sugieren que el CVd-IV comparte mayor similitud con el CEVd que con el CCCVd. En cidra etrog, el CVd-IV ocasiona la aparición de síntomas intermedios de epinastia foliar después de un verano caliente (Puchta *et al.*, 1991).

1.5.6. *Citrus viroid* original sample (CVd-OS). Este viroide fue identificado por primera vez en Japón y consiste de 330-331 nt, una CCR característico del género *Apscaviroid*, presentando una similitud cercana a 68% con el CVd-III (Ito *et al.*, 2001). El CVd-OS presenta característica quimérica con el CVd-III y el *Apple dimple fruit viroid* en el dominio C y dominio TL, incluyendo una secuencia duplicada en la cadena inferior de la CCR del género *Pospiviroid* en el dominio TL. El CVd-OS también comparte similitud con el CEVd en la cadena inferior del dominio TR y dominio V, incluyendo la secuencia idéntica en el dominio TR de CEVd y CVd-IV.

1.5.7. *Citrus viroid* 1-Low similarity sequence (CVd-I LSS). Este viroide fue encontrado como una población de secuencias de CVd-I diferente por su longitud, con mayor similitud a CVd-1a y se le denominó CVd-I LSS. El porcentaje de homología de esta población con relación al CVd-I es de 82-85%, por lo que se sugirió considerarla como una nueva especie, además un análisis filogenético ubicó la población de CVd-I-LSS y la de CVd-I en diferentes clados (Ito *et al.*, 2000).

El CVd-I LSS en cidra se caracteriza por ocasionar al igual que CVd-I, un doblez moderado en las hojas y una epinastia más severa que la ocasionada por el CVd-I. Se ha propuesto que dicha población debería considerarse definitivamente, como una especie nueva, si el rango de hospedantes fuera muy diferente a las del CVd-I. Sin embargo, si esta diferencia no es muy grande, podría considerarse como una variante nueva de la misma especie. La diferencia encontrada en las secuencias, aunque es alta, podría explicarse como ocurre con algunas variantes de CEVd y GYSVd (*Grapevine yellow speckle viroid*), en la cual algunas variantes poseen una homología menor al 90%. Sin embargo, el Comité internacional de taxonomía de virus, menciona que las secuencias con homologías mayores al 90% deben considerarse como variantes de la misma especie (Flores *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2000).

Cuadro 1.1. Variantes y principales síntomas inducidos por siete especies de CVds.

Viroide	Variantes	Síntomas	Referencia
CEVd		Enanismo, rajaduras de la corteza, descortezamiento del tronco y frutos de menor tamaño	Broadbent <i>et al.</i> , 1971; Bitters <i>et al.</i> , 1987.
*CVd-I	a y b	Enanismo, epinastia moderada y puntos necróticos en vena media	Gandía y Duran-Vila, 2004; Foissac y Duran-Vila, 2000.
CVd-OS		Necrosis moderada del pecíolo y doblez de la hoja	Ito <i>et al.</i> , 2001.
CVd-I LSS		Doblez de hojas similar a CVd-I, y epinastia más severa que la inducida por CVd-I	Ito <i>et al.</i> , 2000.
CVd-III	A, b, c y d	Epinastia y necrosis en pecíolos	Van Vuuren y Da Graca, 1996a y 1996b.
HSTVd (Variante CCaVd)	A, b y c	Clorosis de venas foliares, enanismo, picado del tallo y formación de una rodilla en la zona de injerto	Childs, 1952; Roistacher, 1995.
CVd-IV		Epinastia foliar, necrosis de vena media, enanismo y rizado foliar no severo	Puchta <i>et al.</i> , 1991; Semancik y Vidalakis 2005.

* *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus viroid I* (CVd-I), *Citrus viroid original sample* (CVd-OS), *Citrus viroid low sequence similarity* (CVd-I-LSS), *Citrus viroid III* (CVd-III), *Hop stunt viroid* (HSVd variante *Citrus cachexia viroid* (CCaVd) y *Citrus viroid IV* (CVd-IV).

1.6. Diagnóstico de los viroides

Los primeros métodos de diagnóstico de los viroides de los cítricos fueron el uso de plantas indicadoras y la reacción de color con floroglucinol-HCl (Childs *et al.*, 1958; Broadbent *et al.*, 1971). Otro método de diagnóstico utilizado fue la electroforesis en geles de poliacrilamida del ARN de plantas infectadas (Rivera-Bustamante *et al.*, 1986), cuya desventaja es su falta de sensibilidad para detectar a los viroides cuando se encuentran en concentraciones bajas en las plantas infectadas (Duran-Vila *et al.*, 1986). En la actualidad, se utilizan procedimientos moleculares más rápidos y sensibles para la detección de los viroides, como la técnica de RT-PCR, con la cual, se puede obtener cDNA del CVd a partir de 0.1 ng de ARN de los tejidos afectados (Yang *et al.*, 1992; Alvarado, 1998), así como la RT-PCR múltiple utilizada para la detección de varios viroides en una sola prueba (Levy *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 2002a y 2002b).

1.7. Patogénesis

Los viroides son capaces de inducir silenciamiento de genes de importancia fisiológica para la planta hospedante, mediante ARNs de interferencia. Este silenciamiento de genes provoca la expresión de síntomas en las plantas infectadas por estos patógenos (Wang *et al.*, 2004).

En plantas de tomate infectados por PSTVd, los ARNs pequeños de interferencia se acumulan en el citoplasma y no en el núcleo de las células, mientras que el ARN del viroide (familia *Pospiviroidae*) se acumula solo en el núcleo (Denti *et al.*, 2004; Carbonell *et al.*, 2008). Por otro lado, los viroides: *Peach latent mosaic viroid*, *Avocado sunblotch viroid* y *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (familia *Avsunviroidae*) se replican y acumulan en el cloroplasto además inducen un incremento en la concentración de ARNs de interferencia, aunque el viroide *Avocado sunblotch* provoca solamente un ligero incremento en la cantidad de los ARNs de interferencia aparentemente no específicos para el viroide (Martínez de Alba *et al.*, 2002). La concentración del viroide ASBVd en plantas de aguacate y los

síntomas de la enfermedad son factores que influyen en la detección y el título de los ARNs de interferencia que participan en el silenciamiento post transcripcional; además se detectaron ARNs de interferencia en tejidos dañados (moteados, blanqueados) pero no en tejidos aparentemente sanos de la misma hoja (Markarian *et al.*, 2004). Por otro lado, Martínez de Alba y colaboradores (2002) mencionan que la cantidad de ARNs de interferencia no está directamente relacionada con el grado de virulencia de los aislados del viroide, incluso se ha observado en algunos casos una correlación inversa entre la concentración del ARN del viroide y la concentración de los ARNs de interferencia en las plantas infectadas con los viroides *Avocado sunblotch*, *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* y *Peach latent viroid* (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez de Alba *et al.*, 2002). Lo anterior es consistente con la participación de los ARNs de interferencia en el silenciamiento post-transcripcional de genes como una respuesta de defensa del hospedante, lo cual podría influir en el efecto patogénico de los viroides al disminuir su título en los tejidos (Martínez de Alba *et al.*, 2002).

Los viroides provocan algunas alteraciones a nivel molecular como la activación transcripcional del gen de la proteína cinasa PKV (55 kDa) en plantas infectadas con variantes severas o intermedias del PSTVd y a muy bajo nivel en plantas infectadas por variantes ligeras (Hammond y Zhao, 2000).

Las proteínas tipo osmotina (grupo PR-5), son inducidas de manera específica por el viroide de la planta macho en plantas de tabaco y de tomate (Ruiz-Medrano *et al.*, 1992). El CEVd ocasiona un decremento del nivel de putrescina libre en tomate, cuya concentración es regulada por la actividad de la ornitina descarboxilasa, que disminuye en plantas de tomate infectadas por el CEVd (Bélles *et al.*, 1993). El ácido gentísico se acumula 150 veces más, con relación a plantas no infectadas por CEVd, debido a que el ácido benzoico y ácido salicílico son rápidamente convertidos a ácido gentísico. El ácido gentísico exógeno provocó la acumulación de las proteínas PR (P23, P32 y P34) antifúngicas también inducidas por el CEVd, pero el nivel de estas proteínas no aumentó con tratamientos con ácido

salicílico exógeno, el cual es capaz de provocar el aumento de otras proteínas PR inducidas por el CEVd en tomate (Bélles *et al.*, 1999).

1.8. Manejo de la enfermedad

El manejo de los viroides se realiza en forma diversa, por ejemplo el uso de plantas transgénicas de papa que expresaron ribozimas en altas concentraciones, presentaron un alto nivel de resistencia y una disminución en la acumulación del PSTVd (Yang *et al.*, 1997). Plantas de tabaco y papa transformadas con el gen de la proteína pac 1 (ARNsa específica de ARN de doble cadena, derivada de *Schizosacharomises pombe*), presentaron resistencia contra la infección del PSTVd. Este mismo gen indujo en plantas transgénicas de crisantemo resistencia al PSTVd y al viroide del enanismo del crisantemo. En estas plantas, la acumulación del viroide se redujo en un 50 a 75 % (Ishida *et al.*, 2002). Otros autores reportaron que el uso de extractos de raíz de *Mirabilis jalapa* que contiene una proteína tipo RIP (Ribosome inactivating proteins), inhibió la infección de CEVd al 100% en plantas de tomate y papa (Vivanco *et al.*, 1999).

Semancik y colaboradores (1992; 1997), han realizado intentos por utilizar al CEVd para generar enanismo en los árboles de naranjo, con el objetivo de mejorar la producción. Para ello, inocularon árboles de naranjo valencia con viroides del grupo CVd-Ia, CVd-IIa y CVd-IIIb, provocando enanismo en todas las plantas inoculadas y un aumento en la producción del 15 % con relación al testigo, a pesar de presentarse reducción del dosel del 20 %. Los mismos investigadores observaron que estos tres grupos de viroides interfirieron de manera efectiva con la infección del viroide de la cachexia, lo cual sugiere que la protección cruzada es una estrategia de manejo que podría ser utilizada con los viroides en los cítricos, considerando las precauciones necesarias, ya que una variante de un mismo viroide puede ser útil en la protección cruzada, mientras otra variante podría generar pérdidas importantes en el cultivo (Van Vuuren y Da Graca, 1996a y 1996b; Verniere *et al.*, 2004).

1.9. PERSPECTIVAS

El peligro que representan los viroides de los cítricos en las nuevas plantaciones con portainjertos diferentes al naranjo agrio, así como en varios cultivos hortícolas en los cuales se ha demostrado la capacidad infectiva de los viroides, deben ser investigados, con el objetivo de contar con información básica tales como la incidencia de estos patógenos en los cultivos y los hospedantes alternos así como, su evolución para emitir recomendaciones específicas a los agricultores. Por otro lado, los diferentes mecanismos de transmisión incluyendo su eficiencia y los factores que alteran la eficiencia de la transmisión deben ser estudiados para cada viroide en las regiones citrícolas de nuestro país. Sin embargo, determinar la posible transmisión por semilla del *Citrus cachexia viroid* y *Citrus exocortis viroid* resulta ser igualmente relevante considerando que estos dos viroides se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones citrícolas del mundo. La caracterización del rango de hospedantes de cada CVd es otro aspecto que requiere ser investigado, así como la determinación precisa de las alteraciones que ocasionan estos patógenos en sus hospedantes, cuando están presentes de manera individual o en mezclas. Será de gran relevancia contar con toda la información anterior, debido a las implicaciones prácticas que esta pueda tener en el diseño del manejo de cultivos cítricos y hortalizas de México.

En cuanto a la interacción planta-viroide algunas de las preguntas que permanecen sin respuesta son: ¿Es el silenciamiento de genes el único mecanismo por el que los viroides provocan la aparición de síntomas? Si es así ¿Porque los ARNi específicos al viroide no siempre existen en la planta?, ¿Por qué en algunos casos la acumulación de estos ARNi no tiene ninguna relación con la concentración del viroide?, ¿Cuáles son los genes blanco sobre los que actúa el silenciamiento de genes en la interacción viroide-planta?

1.10. LITERATURA CITADA

- Alvarado, G. O. G. 1998. Viroide de los cítricos: Implementación de técnicas moleculares de detección y determinación de infección natural en el campo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 86 p.
- Amari, K., Gomez, G., Myrta, A., Di Terlizzi, B., and Pallás, V. 2001. The molecular characterization of 16 new sequence variants of *Hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *Journal of General Virology* 82: 953-962.
- Ashulin, L., Lachman, O., Hadas, R., and Bar-Joseph, M. 1991. Nucleotide sequence of a new viroid species, citrus bent leaf viroid (CBLVd) isolated from grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research* 19: 4767.
- Barbosa, C. J., Pina, J. A., Perez-Panadés, J., Bernard, L., Serra, P., Navarro, L., and Duran-Vila, N. 2005. Mechanical transmission of citrus viroids. *Plant Disease* 89:749-754.
- Bellés, J. M., Pérez-Amador, M. A., Carbonell, J., and Conejero V. 1993. Correlation between ornithine descarboxylase and putrescine in tomato plants infected by *Citrus exocortis* viroid or treated with ethephon. *Plant Physiology* 102:933-937.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J., and Conejero V. 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Molecular Plant Microbe Interaction* 12: 227-235.
- Bitters, W. P., Duran-Vila, N., and Semancik, J. S. 1987. Effect of citrus exocortis viroid on flower and fruit structure and development on Etrog citron. *Plant Disease* 71: 397-399.

- Bonfiglioli, R. G., McFadden, G. I., and Symons, R. H. 1994. *In situ* hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *The Plant Journal* 6:99-103.
- Broadbent, P., Fraser, L. R., and Long, J. K. 1971. Exocortis virus in dwarfed citrus trees. *Plant Disease Reporter* 55: 998-999.
- Campbell, C. L., and Madden, L. V. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley and Sons. New York. 512 p.
- Carbonell, A., Martinez de alba, A. E., Flores, R., and Gao, S. 2008. Double strand RNA interferes in a sequence – specific manner with the infection of representative members of the two viroid families. *Virology* 371: 44-53.
- Chela-Flores, J. 1994. Are viroids molecular fossils of the RNA world? *Journal of Theoretical Biology*. 166: 163-166.
- Candresse, T., Gora-Sochacka, A., and Zagórski, W. 2001. Restoration of secondary hairpin II is associated with restoration of infectivity of a non-viable recombinant viroid. *Virus Research* 75: 29-34.
- Childs, J. F. L. 1950. The cachexia disease of Orlando Tangelo. *Plant Disease Reporter* 34: 295-298.
- Childs, J. F. L. 1952. Cachexia disease, its bud transmission and relation to xyloporosis and tristeza. *Phytopathology* 42: 265-268.
- Childs, J. F. L., Norman, G. G., and Eichhorn, J. L. 1958. A color test for exocortis infection in *Poncirus trifoliata*. *Phytopathology* 48: 426-433.
- Daròs, J. A., Marcos, J. F., Hernández, C., and Flores, R. 1994. Replication of avocado sunblotch viroid: Evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91:12813-12817.
- Denti, M. A., Boutla, A., Tsagris, M., and Tabler, M. 2004. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *The Plant Journal* 37: 762-769.
- Diener, T. O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, New York. USA. 344 p.

- Ding, B., Itaya, A., and Woo, Y. M. 1999. Plasmodesmata and cell to cell communication in plants. *International Review of Cytology* 190: 251-316.
- 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., Medina, V., Pina, J. A., Ortega, C., Molins, M. I., and Navarro, L. 1991. Growth and morphogenesis of citrus tissue cultures infected with psorosis, vein enation and cachexia. *Phytopathology* 81: 824-831.
- Elleuch, A. Fakhfakh, H., Jendoubi, L., Bessaies, N., and Marrakchi, M. 2003. Comparative analysis of techniques for detection of grapevine of citrus viroid in Tunisia. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 33: 369-374.
- Fagoaga, G., and Durán-Vila, N. 1996. Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetable crops. *Plant Pathology* 45: 45-53.
- Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., and Diener, T. O. 1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Archives of Virology* 143:623-630.
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M-E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., and De la Peña, M. 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Letters* 567: 42-48.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez, A. E., Darós, J. A., and Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid- host interaction. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117-139.
- Foissac, X., and Duran-Vila, N. 2000. Characterization of two Citrus apscaviroids isolated in Spain. *Archives of Virology* 145: 1975-1983.
- Gafny, R., Mogilner, N., Nitzan, Y., Ben-Shalom, J., and Bar-Joseph, M. 1995. The Movement and distribution of citrus tristeza virus and citrus exocortis viroid in citrus seedlings. *Annual Applied of Biology* 126:465-470.

- Gandía, M., and Duran-Vila, N. 2004. Variability of the progeny of a sequence variant of *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd). *Archives of Virology* 149: 407-416.
- Gómez, G., and Pállas, V. 2001. Identification of an *In vitro* ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Molecular Plant Microbe Interactions* 14: 910-913.
- Gozmanova, M., Denti, M. A., Minkov, I. N., Tsagris, M., and Tabler, M. 2003. Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Research* 31: 5534-5543.
- Hammond, R. W. 1994. Agrobacterium –mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology* 201: 36-45.
- Hammond, R. W., and Zhao, Y. 2000. Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by *Potato spindle tuber viroid*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 903-910.
- Hataya, T., Nakahara, K., Ohara, T., Ieki, H., and Kano, T. 1998. Citrus viroid Ia is a derivative of citrus bent leaf viroid (CVD-Ib) by partial sequence duplications in the right terminal region. *Archives of Virology* 143: 971-980.
- Ishida, I., Tukahara, M., Yoshioka, M., Ogawa, T., Kakitani, M., and Toguri, T. 2002. Production of anti-virus, viroid plants by genetic manipulations. *Pest Management Science* 58: 1132-1136.
- Ito, T., Ieki, H., and Ozaki, K. 2000. A population of variants of a viroid closely related to citrus viroid-I in citrus plants. *Archives of Virology* 145: 2105-2114.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., and Ito, T. 2001. Characterization of a new citrus viroid species tentatively termed Citrus viroid OS. *Archives of Virology* 146: 975-982.
- Ito, T., Ieki, H., and Ozaki, K. 2002a. Simultaneous detection of citrus viroids and *Apple stem grooving virus* from citrus plants by multiplex reverse

- transcription polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 106: 235-239.
- Ito, T., Ieki, H., Ozaki, K., Iwanami, T., Nakahara, K., Hataya, T., Ito, T., Isaka, M., and Kano, T. 2002b. Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce Exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology* 92: 542-547.
- Jasso, A. J. 2005. Evaluación del efecto de la cachexia, exocortis y blight sobre la producción y desarrollo de las huertas de cítricos en Yucatán. *Memorias de la Segunda reunión estatal de investigación agropecuaria, forestal y pesca. Mérida Yucatán México.* p. 233-236
- Keese, P., and Symons, H. R. 1985. Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 4582-4586.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K-H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G., and Riesner, D. 2005. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology* 20: 1-13.
- Levy, L., Hadidi, A., and Garnsey, S. M. 1992. Reverse transcription-polymerase chain reaction assays for the rapid detection of citrus viroids using multiplex primer sets. *Proceedings of the International Society of Citriculture* 2: 800-803.
- Maniataki, E., Tabler, M., and Tsagris, M. 2003. Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71 nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9: 346-354.
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W., and Semancik, J. S. 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology* 149:397-406.
- Martínez de Alba, A. E., Flores, R., and Hernández, C. 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 13094-13096.

- Mendonca, V. A., Da Clara, M. I. E., y Oliveira, C. 1977. Notes on exocortis in Portugal. *Memorias del Congreso Mundial de Citricultura Vol. II. Murcia, Valencia, España. pp. 575-577.*
- Mink, G. I. 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annual Review of Phytopathology 31: 375-402.*
- Mishra, M. D., Hammond, R. W., Owens, R. A., Smith, D. R., and Diener, T. O. 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology 72: 1781-1785.*
- Ochoa, C. F. M., Rocha-Peña, M. A., y Lee, R. F. 1994. Impacto del virus de la tristeza en la citricultura venezolana: cronología de eventos. *Revista Mexicana de Fitopatología 12: 97-105.*
- Owens, R. A., Yang, G., Gundersen-Rindal, D., Hammond, R. W., Candresse, T., and Bar-Joseph, M. 2000. Both point mutation and recombination contribute to the sequence diversity of citrus viroid III. *Virus Genes 20: 243-252.*
- Owens, R. A., Blackburn, M., and Ding, B. 2001. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Molecular Plant Microbe Interactions 14: 905-909.*
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A. J., Denti, M. A., Baulcombe, D. C., Tsagris, M., and Tabler, M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research 29: 2395-2400.*
- Palukaitis, P. 1987. Potato spindle tuber viroid: investigation of the long-distance, intra-plant transport route. *Virology 158: 239-241.*
- Puchta, H., Ramm, K., Luckinger, R. Hadas, R., Bar, J. M. and Sanger, H. L. 1991. Primary and secondary structure of citrus viroid IV (CVd-IV) a new chimeric present in dwarfed grapefruit in Israel. *Nucleic Acids Research 19: 6640.*
- Pujol, A. R. 1965. Exocortis and other problems with trifoliolate orange rootstock. *Proceedings of the third Conference of the International Organization of Citrus Virologist. University of Florida Press. Gainesville USA. pp. 128-133.*

- Qi, Y., and Ding, B. 2003a. Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *The Plant Cell* 15: 2566-2577.
- Qi, Y., and Ding, B. 2003b. Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell* 15: 1360-1374.
- Rakowski, A. G., Szychowski, J. A., Avena, Z. S., and Semancik, J. S. 1994. Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *Journal of General Virology* 75:3581-3584.
- Reanwarakorn, R., and Semancik, J. S. 1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *Journal of General Virology* 79: 3163-3171.
- Reanwarakorn, R., and Semancik, J. S. 1999. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89: 568-574.
- Rivera-Bustamante, R. F., Gin, R., and Semancik, J. S. 1986. Enhanced resolution of circular and linear molecular forms of viroid and viroid-like RNA by electrophoresis in a discontinuous-pH system. *Analytical Biochemistry* 156: 91-95.
- Rocha-Peña, M. A., y Padrón-Chávez, J. E. 1992. Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza. Publicación especial No.2. Campo Experimental General Terán. INIFAP. México 48 p.
- Roistacher, C. N. 1995. Graft transmissible diseases of citrus handbook for detection and diagnosis. FAO. Roma, Italy. 286 p.
- Ruiz-Medrano, R., Jiménez-Moraila, B., Herrera-Estrella, L., and Rivera-Bustamante, R. F. 1992. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. *Plant Molecular Biology* 20: 1199-1202.
- Salibe, A. A., and Moreira, S. 1965. Seed transmission of citrus virus. Proceedings of the third Conference of the International Organization of Citrus Virologist. University of Florida Press. Gainesville USA. pp. 139-142.

- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R. W., Diener, T. O., and Owens, R. A. 1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 10104-10108.
- Sano, T., Hataya, T., and Shikata, E. 1988. Complete nucleotide sequence of a viroid isolated from etrog citron, a new member of hop stunt viroid group. *Nucleic Acids Research* 16: 347.
- Semancik, J. S., and Vidalakis, G. 2005. The question of *Citrus viroid* IV as a *Cocadviroid*. *Archives of Virology*: 150:1059-1067.
- Semancik, J. S., Roistacher, C. N., Rivera-Bustamante, R., and Duran-Vila, N. 1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationships to viroid of the exocortis disease complex. *Journal of General Virology* 69: 3059-3068.
- Semancik, J. S., Gumpf, D. J., and Bash, J. A. 1992. Interference between viroids inducing exocortis and cachexia disease in citrus. *Annals of applied Biology* 121: 577-583.
- Semancik, J. S., Szychowski, J. A., Rakowski, A. G., and Symons, R. H. 1994. A stable 463 nucleotide variant of citrus exocortis viroid produced by terminal repeats. *Journal of General Virology* 75: 727-732.
- Semancik, J. S., Rakowski, A. G., Bash, J. A., and Gumpf, D. J. 1997. Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of "Valencia" orange. *Journal of Horticultural Science* 72: 563-570.
- Serra, P., Barbosa, C. J., Darós, J. A., Flores, R., and Duran-Vila, N. 2008. Citrus viroid V: Molecular characterization and synergistic interactions with the others members of the genus *Apscaviroid*. *Virology* 370: 102-112.
- Silva-Vara, S., Peña del Río, M. A., Peña-Martínez, R., Villegas-Jiménez, N., Byerly-Murphy, K. F., y Rocha-Peña, M. A. 2001. Distribución del Virus de la tristeza en tres plantaciones comerciales de cítricos del estado de Nuevo de León, México. *Agrociencia* 35: 441-450.
- Skaria, M., Miao, H., and Solis, G. N. 1994. Prevalence and partial characterization of citrus exocortis and other citrus viroids in Texas. *Phytopathology* 84: 1072 (abstract).

- Skoric, D., Conerly, M., Szychowski, J. A., and Semancik, J. S. 2001. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature-sensitive reaction. *Virology* 280:115-123.
- Stasys, R. A., Dry, I. B., and Rezaian, M. A. 1995. The termini of a new citrus viroid contain duplications of the central conserved regions from two viroid groups. *FEBS Letters* 358: 182-184.
- Szychowski, J. A., Vidalakis, G., and Semancik, J. S. 2005. Host-directed processing of *Citrus exocortis viroid*. *Journal of General Virology* 86: 473-477.
- Tabler, M., and Tsagris, M. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS in Plant Science* 9: 339-348.
- Uc-Vázquez, A., Rodríguez-García, C. M., y Moreno-Valenzuela, O. A. 2005. Presencia de viroides de los cítricos e incidencia de CcaVd y CEVd en Yucatán México. *Memorias del XXXII congreso nacional de Fitopatología y VII congreso internacional de Fitopatología*. Chihuahua, Chi. México. p.78.
- Van Vuuren, S.P., and DA Graca, J. V. 1996a. Effects of citrus tristeza virus isolates and a Citrus viroid isolate on growth and production of delta valencia on yuma citrange rootstock. *Proceedings of Thirteenth conference International Organization of Citrus Virologist*. Riverside, California USA. pp. 157-161.
- Van Vuuren, S. P., and DA Graca, J. V. 1996b. Response of valencia trees on different rootstocks to two citrus viroid isolates. *Proceedings International Social Citriculture* 2: 705-710.
- Verhoeven, J. Th. J., Jansen, C. C. C., Willems, T. M., Kox, L. F. F., Owens, R. A., and Roenhorst, J. W. 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis viroid*, *Columnea latent viroid*, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 823-831.
- Vernière, C., Perrier, X., Dubois, C., Dubois, A., Botella, L., Chabrier, C., Bové, J. M., and Duran-Vila, N. 2004. Citrus viroids: Symptom expression and effect on vegetative growth and yield of Clementine trees grafted on trifoliate orange. *Plant Disease* 88:1189-1197.

- Vidalakis, G., Davis, J. Z., and Semancik, J. S. 2005. Intra-population diversity between citrus viroid II variants described as agents of cachexia disease. *Annals of Applied Biology* 146: 449-458.
- Villareal, G. L. A. 2001. Antecedentes y situación de la tristeza de los cítricos en México. *Memorias del Simposio Internacional Virus tristeza de los cítricos*. CD. Victoria Tamaulipas, México.
- Visvader, J. E., and Symons, H. R. 1983. Comparative sequence and structure of different isolates of citrus exocortis viroid. *Virology* 130: 232-237.
- Visvader, J. E., and Symons, H. R. 1985. Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research* 13: 2907-2920.
- Vivanco, J. M., Querci, M., and Salazar L. F. 1999. Antiviral and antiviroid activity of MAP- containing extracts from *Mirabilis jalapa* roots. *Plant Disease* 83: 1116-1121.
- Wan Chow Wah, Y. F., and Symons, R. H. 1999. Transmission of viroids via grape seeds. *Journal of Phytopathology* 147: 285-291.
- Wang, M-B., Bian, X-Y., Wu, L-M., Liu, L-X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R-M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., and Waterhouse, P. M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 3275-3280.
- 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.
- Woo, Y. M., Itaya, A., Owens, R. A., Tang, L., Hammons, R. W., Chou, H. C., Lai, M. M. C., and Ding, B. 1999. Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in impermeabilized protoplast. *The Plant Journal* 17: 627-635.
- Yang, X., Hadidi, A., and Garnsey, S. M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. *Phytopathology* 82: 279-285.

- Yang, X., Yie, Y., Zhu, F., Liu, Y., Kang, L., Wang, X., and Tien, P. 1997. Ribozyme-mediated high resistance against Potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 94:4861-4865.
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y-M., Owens, R., and Ding, B. 2001. Cellular basis of Potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279: 69-77.

CAPITULO 2

Incidence and Molecular characterization of citrus viroids in Yucatan, Mexico*

¹Alberto Uc-Varguez and Oscar A. Moreno-Valenzuela

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, Yucatán, México. Telephone: +52(999)9428330; Fax: +52(999)9813900. Email: ucalber@yahoo.com.mx; oamv@cicy.mx

Keywords: citrus viroids, incidence, molecular characterization

* This Chapter will be send to publish in Virus genes

2.1. ABSTRACT

The main cultivated citrus in Mexico are oranges, lemons, grapefruit and mandarin orange, all of them grafted on sour orange rootstock, due to its vigor, high production, and an increased resistance to pathogens as viroids and *Phytophthora* sp.; although it is more susceptible to *Citrus tristeza virus* (CTV). However, the dissemination of its principal vector the brown citrus aphid into the commercial orchards provoked the use of resistant rootstocks to CTV which are susceptible to viroids, and then can become a major problem.

Citrus exocortis viroid (CEVd) and *Citrus cachexia viroid* (CcaVd) have been found in all citrus crops in the world. However the incidence and distribution of CEVd and CcaVd are unknown in Yucatan and the other region of Mexico, also the presence of the others citrus viroids are unknown. This situation have caused that the Mexico's citriculture very susceptible to the detriment of all Mexicans citricultures and to people depending of this activity.

In this article we report the incidence and distribution of two principal CEVd, CcaVd viroids and the presence of the others citrus viroid species as *Citrus viroid*-I, *Citrus viroid*- III, *Citrus viroid*-IV including two viroids proposed as new citrus viroid species, *Citrus viroid*- OS and *Citrus viroid* I-LSS. The existence of mixture of viroids in the same plant will be discussed and its perspective for Mexicans citriculture.

2.2. INTRODUCTION

Mexico has an area of 523 505 ha of citrus fruit and is considered one of the major producers of citrus at the world (1).

The main citrus crops in Mexico are oranges, lemons, grapefruit and mandarin orange on sour orange rootstock. However, the detection of *Citrus tristeza virus* in 1998 and the spread of the brown citrus aphid (principal vector of CTV) into commercial orchard of citrus plant since 2000 in Mexico, prompted proactive strategies for CTV management in the country (2). The change of the CTV susceptible rootstock for resistance rootstock is one of the options that the citrus industry takes as a CTV management strategy (3). However, almost all rootstocks resistant to CTV are sensible to viroids (4), consequently viroid diseases can become a bigger problem with the change of rootstock (5), as in Belize and in Venezuela occurred (6).

Viroids are the smallest plant pathogens consisting of unencapsidated, circular and singles strand RNA with 246 to 463 nucleotides (7). Citrus viroids have been classified based on nucleotide sequences into five species: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSTVd), *Citrus viroid III* (CVd-III) and *Citrus viroid IV* (CVd-IV); additionally, there are three viroids which have been proposed as new viroids species *Citrus viroid OS* (CVd-OS), *Citrus viroid I-LSS* (CVd-I LSS) and *Citrus viroid V* which have been found infecting citrus (8, 9, 10). CBLVd, CVd-I-LSS, CVd-III, and CVd-OS are classified in the Apscaviroid genera, while CEVd, HSTVd and CVd-IV are classified in the Pospiviroid, Hostuviroid, and Cocadviroid genera respectively (11, 8, 12). However Semancik and Vidalakis (13) proposed to CVd-IV as a member of the Pospiviroid genera.

All citrus viroids species infect citrus trees grafted on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstock (14, 15), some strains of them do not induce symptoms and others do it on their host. CEVd and CcaVd are considered the most important for

Mexico's citriculture because those pathogens affect almost all citrus trees used as resistance rootstock to CTV (4, 2); beside this two are disease-causing viroids on sensitive citrus hosts. CEVd is the causal agent of the citrus exocortis disease, which cause bark scaling and stunting on citrus tree grafted on trifoliolate orange rootstock (14, 16). *Citrus cachexia viroid* (CcaVd), the most pathogenic variant of the HSVd, is the causal agent of the citrus cachexia disease, inducing bark cracking, small pits in the wood and the gum deposit in the bark (14, 17). Also, citrus viroids other than CEVd in complex can cause severe bark scaling in trifoliolate orange rootstocks as CEVd (16). Using biological indexing with citron etrog, CEVd was reported in Mexico, with incidences higher than 50% (18, 19) thus the incidence could have been underestimated. On the other hand the presence of CcaVd in Persa lime was reported in several states from Mexico (20, 21), so in this study, the incidence and distribution of CEVd and CcaVd in Yucatan Mexico were examined using RT-PCR method, and the molecular characterization of citrus viroids detected in citrus trees of this region of Mexico was done.

2.3. MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Citrus plant collection. Plant samples were collected in seven commercial orchards (Kinchil, Samahil, Ticul, Oxkutzcab, Dzan, San Francisco, and Espita), of the three representative citrus growing areas in Yucatan Mexico (south, east and center of the state). Every orchard was divided in five points (four cardinal points and the center). Eleven citrus trees were sampled in every selected point, using a systematic sampling method (22) (a total of 387 trees were sampled in the seven orchards). The 387 trees sampled in this study included the following: 222 sweet oranges (*Citrus sinensis*) the most popular species in Yucatan, 118 Persa lime (*Citrus latifolia*), 18 sour orange (*Citrus aurantium*), 12 grape fruit (*Citrus grandis*), 11 limes (*Citrus aurantifolia*) and 6 mandarins (*Citrus reticulata*) on *Citrus aurantium*,

Citrus macrophila, Citrus volkameriana or Poncirus trifoliata rootstocks. Four shoots were taken for every tree sampled. All the samples were preserved to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing.

2.3.2. Nucleic acids extraction and viroid amplification. Plant samples (0.2 g) were homogenized in 1 ml of extraction buffer (Trizol Invitrogen), as described by Chonszinky and Sacchi, (23). Full-length double-stranded viroids cDNA were synthesized by RT-PCR using oligonucleotides (Table 2.1), designed to amplify the complete genome of each of the target viroids following the method described by Alvarado and coworkers (20). MMLV reverse transcriptase (Ambion), and Red Taq polymerase (Biolase RedTM DNA Polymerase, Boline) were used for all amplifications. Second strand synthesis and amplification for each citrus viroid was performed using 2 μl of cDNA. PCR products were analyzed in a 2% agarose gel, which was visualized with ethidium bromide in a fotodocumentation equipment (Kodak EDAS 290). CEVd and CcaVd were analyzed in the 387 collected samples, and CBLVd, CVd-1-LSS, CVd-OS, CVd-III, and CVd-IV were analyzed in 5 samples of each orchard, for a total of 35 samples.

Table 2.1. Specific Oligonucleotides and amplification conditions used to amplify full length genome by RT-PCR of each Citrus viroids.

Sequece 5'- 3'	*CVds	Positio ns	*bp	Thermal program
ccctgaaggacttctcccc atccccggggaaacctggaggaag	CEVd	71-90 91-114	370- 375	45" at 94°C, 45" at 65°C, 45" at 72°C for 34 cicles
acgaccagtcagctcctctg cgtcgacgaaggctcgtcagct	CBLVd	75-94 95-116	315- 329	30" at 94°C, 60" at 64°C, 60" at 72°C for 40 cicles
acgaccgctcagctcctct cgtcgacgaaggctcctcagtc	CVd-1- LSS	76-95 96-117	325- 330	30" at 94°C, 60" at 64°C, 60" at 72°C for 34 cicles
acgacaggtgagttctcctt cgtcgacgaaggcatgtgagct	CVd- OS	63-82 83-104	329- 331	30" at 94°C, 60" at 64°C, 60" at 72°C for 40 cicles
cgcggcagaggctcagatag gatcctctcttgagcccctc	HSVd	259- 278 279-1	295- 303	30" at 94°C, 30" at 65°C, 30" at 72°C for 34 cicles
tcgacgacgacaggaagtt cgaaggcagctaagttggtga	CVd-III	72-91 92-112	291- 297	45" at 94°C, 60" at 62°C, 60" at 72°C for 34 cicles
ggatccctcttcaggtatgt ccggggaaatctcttcagactc	CVd-IV	48-67 68-89	284- 286	30" at 94°C, 45" at 65°C, 45" at 72°C for 34 cicles

*Citrus exocortis viroid, Citrus cachexia viroid, Citrus viroid I, citrus viroid III, Citrus viroid IV, Citrus viroid OS, Citrus viroid I LSS.

2.3.3. Cloning and Sequencing. RT-PCR products of each viroid were purified from the agarose gel using the Qiaex II kit, following the supplier instructions (Qiagen). Products purified were cloned in the pGEM T-Easy vector according to manufacturer instructions (PROMEGA) the cloned fragments were sent to Macrogen Inc. (Korea) for sequencing. Sequences were manually edited using EditSeq (DNASTAR ver 5.08 Madison USA), to remove vector's sequences. The resulting Citrus viroid sequences were compared using BLAST to determine each sequence's preliminary identification.

2.3.4. Sequence analysis. Sequence identity percentage of the Yucatan viroids were confirmed by analyzing and comparing the complete genome sequences isolates from Yucatan with all the citrus viroid sequences corresponding of each viroid reported in the Genbank database This was done performing a multiple sequence alignments using the Clustal W program of MegAlign (DNASTAR Version 5.08 Madison, USA), with all citrus viroids sequences available in the GenBank database and ICTV criteria was used, that is, if a pair of sequences share 90% or higher identity, is considered the same viroid specie (11). Sequences of the conserved domains of each citrus viroid were located and compared with the reported for each citrus viroid group, using EditSeq version 5.08 of the Lasergene software package from DNASTar (Madison, USA).

Secondary structure of all citrus viroids were predicted using a folding temperature of 25 °C, with the Zuker-Turner *mfold* RNA folding package version 3.2. (24) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>), circular version 2.3. (<http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form-2.3.cgi>) program was also used, because it allows for folding temperature to be changed.

2.3.5. Phylogenetic analysis of citrus viroid. Phylogenetic analysis of the full length viroid sequences was carried out using NONA Version 2.0 (25) and Winclada version 1.08.00 programs (26). The cladogram was built using the eleven CcaVd sequences identified in this study, one CVd-I, CVd-III, CVd-IV, CVd-OS together with the sequences of CcaVd available in the GenBank database.

Several searches were performed using the Parsimony Ratchet algorithm with 200 iterations per search. One tree was held per iteration. No informative characters were deactivated to optimize the tree statistics. The 'goodness of fit' of the data to the resultant phylogenetic trees was based on consistence index (CI) and the retention index (RI) values. A strict consensus tree was reconstructed using Winclada, and statistical support for each major clade was estimated using 1000 iterations of the Jackknife algorithm. The consensus tree built for CcaVd was rooted using a CEVd sequence (AY513268 accession number) which is a specie member of Pospiviroid genera located into *Pospiviroidae* family (phylogenetic analysis will be presented in document apart).

2.4. RESULTS

2.4.1. Citrus excortis viroid Citrus cachexia viroid incidence. RT-PCR products positive to CEVd (Fig. 2.1) showed that incidence of this viroid were as follow: Ticul (65 %), Dzan (53 %), Samahil (35 %), Peto (25 %), and Oxkutzcab (12 %). No samples positive to CEVd were detected in the Kinchil, San Francisco and Espita orchards (Fig. 2.1). The seven commercial citrus orchards sampled were positive to CcaVd as follow: Ticul (67 %), Dzan (23 %), Samahil (46 %), Oxkutzcab (55 %), kinchil (50 %), San Francisco (51) and Espita (33 %) (Fig. 2.2).



Figure 2.1. Products of RT-PCR analysis visualized in 2% agarose gel obtained for 1. *Citrus exocortis viroid* (375bp), 2.- *Citrus cachexia viroid* (300bp), 3.- *Citrus viroids* 1 (329 bp), 4.- *Citrus viroids* IV.

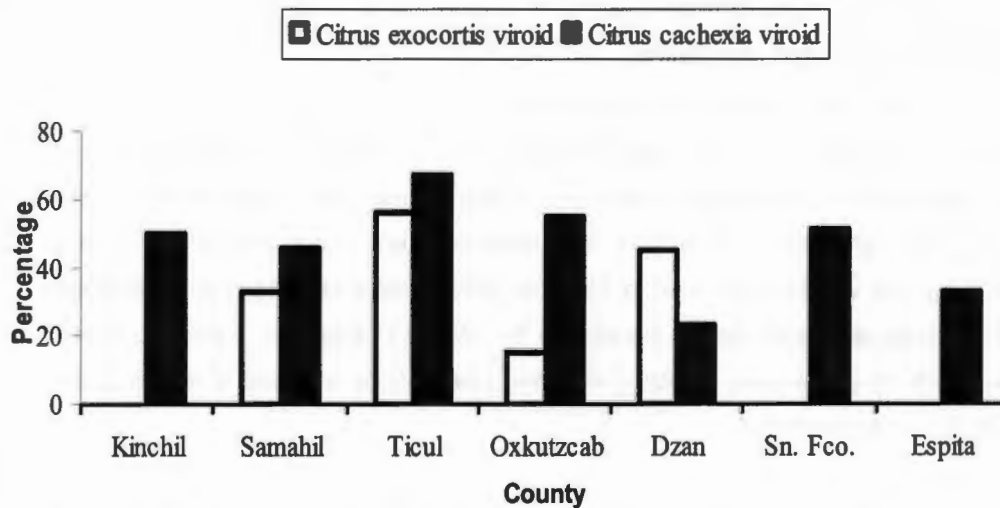


Figure 2.2. Percentage of citrus tree infected by *Citrus cachexia viroid* and *Citrus exocortis viroid* in seven commercial orchards of Yucatan Mexico.

Nine samples resulted positive to CVd-I which three were collected in Oxlutzcab, two in Ticul and four in Sn Francisco. On the other hand six samples were positives to CVd-III which four were collected in Ticul, two in Dzan, Four in Oxlutzcab and five in Sn Francisco.

Four samples resulted positives to CVd-IV which one was collected in Oxlutzcak and three in Sn Francisco. Five samples were positives to CVd-OS which four were collected in Sn Francisco and one in Dzan. Finally four samples resulted positive to CVd-I LSS which three were collected in Sn Francisco and one in Ticul. The citrus especie where the sample was taken is presented in Table 2.2.

2.4.2. Molecular identification of Citrus viroids. Amplified fragments by RT-PCR had molecular sizes specific for each viroid (Fig. 2.1) as expected which indicated that in addition to the CEVd and CcaVd others citrus viroids are present in orchards sampled in Yucatan Mexico as CVd I, CVd III, CVd IV, CVd-OS, and CVd I-LSS. Although the complete genome the last three viroids were not completely sequenced, the PCR products found using oligonucleotides specific were similar in size with reported for those viroids (Fig. 2.1), except CVd-I LSS which is apparently more long than reported previously.

All the citrus species analyzed, including *Citrus sinensis*, *C. aurantium*, *C. grandis*, *C. reticulata*, *C. latifolia* and *C. limon*, were positive to viroids. Furthermore almost all the citrus viroid species were found as a mixture of two, three or four citrus viroid in the same tree (Table 2.2). The most frequent viroid combinations were CEVd + CcaVd which was found in 39 trees of 64 analyzed (60.9 %); 22 of those positives trees corresponded to the specie *C. latifolia* (Table 2.2). Others common citrus viroids mixtures were CcaVd-CVd-I and CcaVd-CVd-IV found in seven plants and six plants respectively.



Figure 2.3. Cracking, epinasty, stem pitting and yellowing observed in citrus plants infected by *Hop stunt viroid* variant isolates from horchard commercial of Yucatan Mexico.

Table 2.2. Number of the citrus tree found with two, three and four different citrus viroid and localities where them were found.

Viroids	Number	citrus specie	Local
*CEVd, CCaVd	39	22 <i>C. latifolia</i> , 2 <i>C. grandis</i> , 7 <i>C. sinensis</i> , 5 <i>C. aurantium</i> , 1 and <i>C. reticulata</i> , 2 lime	23 Ticul, 10 Dzan and 6 Oxxutzcab
CcaVd, CVd-I	7	5 <i>C. latifolia</i> , 1 <i>C. grandis</i> and 1 <i>C. aurantium</i>	4 San Fco and 3 Oxxutzcab
CcaVd, CVd-III	1	1 <i>C. latifolia</i>	San Fco
CcaVd, CVd IV	6	4 <i>C. latifolia</i> , 1 <i>C. grandis</i> and 1 <i>C. sinensis</i>	4 San Fco, 1 Oxxutzcab and 1 Dzan.
CcaVd, CVd I, CVd IV	4	3 lime and 1 <i>C. grandis</i>	3 San Fco and 1 Oxxutzcab
CcaVd, CVd I, CVd IV, CVdLSS	2	2 <i>C. latifolia</i>	San Fco.
CEVd, CcaVd, CVd-LSS	1	<i>C. latifolia</i>	Ticul
CEVd, CVd IV	1	1 <i>C. sinensis</i>	Dzan
CEVd, CVd I, CVd-IV	1	1 <i>C. sinensis</i>	Dzan

*Citrus exocortis viroid, Citrus cachexia viroid, Citrus viroid I, citrus viroid III, Citrus viroid IV, Citrus viroid OS, Citrus viroid I LSS.

A total of 11 CcaVd sequences of Yucatan (CcaVd-Yu) were obtained and those have an identity percentage of 99% between them and sharing 92%

approximately with others sequences reported (17, 27). Some symptoms observed in the plants that resulted CcaVd positive are presented in the Fig. 2.3. Three representatives CcaVd-Yuc were reported in the GenBank database. A comparison between CcaVd Yuc and HSVd variant with the cachexia motif (17, 28, 29) revealed that CcaVd-Yuc sequences does not have the five nt motif of cachexia. The comparisons between CcaVd Yuc and CcaVd 909 variant showed that in the 154 nt CcaVd yuc (except two clones D12183 and D10181) have a T as CcaVd-909 which is inductor to cachexia symptoms. Other differences found in CcaVd Yuc were three changes: C to G (208 nt), G to A (209 nt), A to G (210 nt), and a insertion CTT (245 to 247 nt) in CcaVd Yuc unlike CcaVd 909 variant. On the other hand, CcaVd Yuc sequences having the TCR and CCR sequences identical to hostuviroid group (7) (Fig. 2.4).

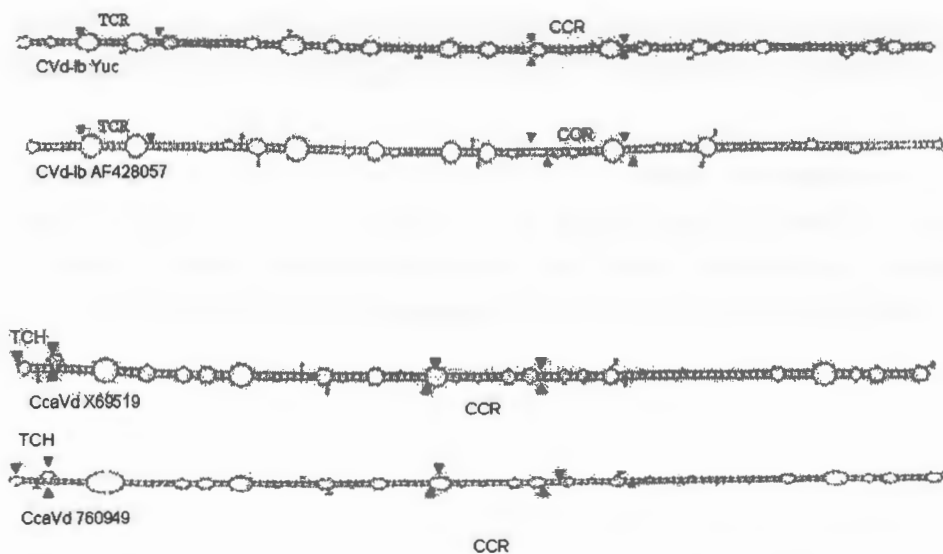


Figure 2.4. Proposed secondary structure of minimum free energy of CVd-Ib Yuc and CcaVd 760949 found in Yucatan compared to CVd Ib AF428057 and CcaVd 760949 reported in Genbank NCBI. Conserved regions (CCR, TCR and TCH) in members of the genus Pospiviroid are marked. The blue arrow points represent

Central conserved region and red arrows points represent Terminal conserved region ór Terminal conserved hairpin.

A CVd I-Yuc sequence of viroid was obtained from Sn Francisco orchard and have a identity percentage of 100 % with a CVd Ib sequence reported in the Genbank database (AF428057 accession number).

We also obtained CVd III, CVd IV, CVd-OS, and CVd I-LSS sequences which shared a 98% of identity with sequences reported in the GenBank. However we could not sequence complete genome of the last three viroids mentioned before.

2.4.3. Phylogenetic analysis of CcaVd. Cladistic analysis of CcaVd-Yu sequences yielded one most parsimonious tree (MPT) of 1003 steps with C.I. 0.71, R.I. 0.91 (Fig. 2.5). A CEVd sequences (AY513268) was used as outgrop. Consensus strict tree was arranged in a ladder-like structure, albeit internal relationships are not fully resolved. CcaVd Yuc sequences formed a different clade comparing to the CcaVd 909, CcaVd IIa and CcaVd IIb variants sequences obtained from the GenBank database, suggesting that CcaVd Yuc are highly related and indicated that CcaVd Yuc have a distinct genetic lineage with a closer relationship to the well characterised non cachexia variant CVd IIa than any known cachexia inducing variants. These clades had a high support as estimated by Jackknife analysis (Fig. 2.5).

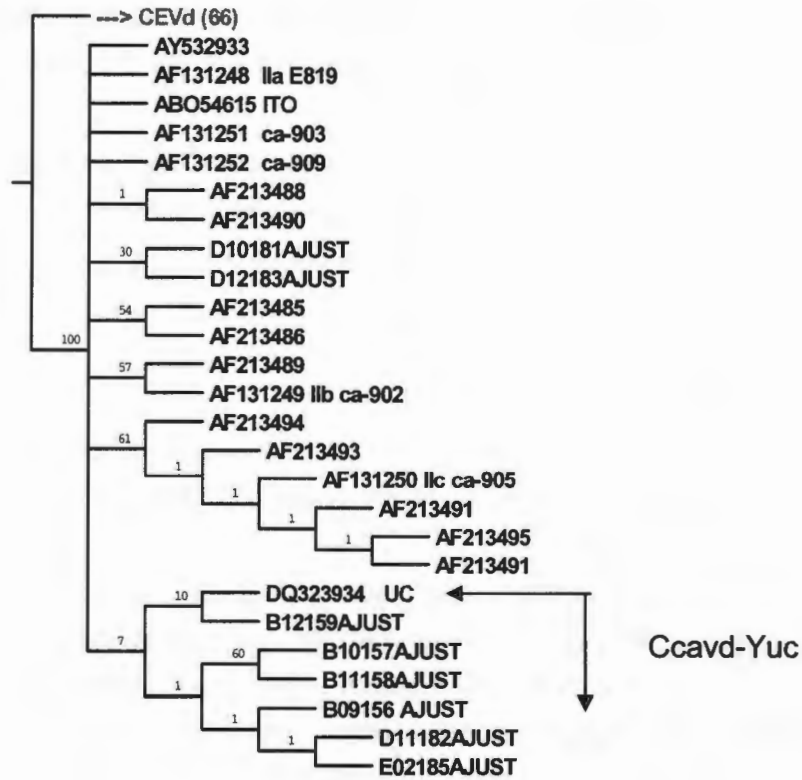


Figure 2.5. Phylogenetic tree built with *Citrus cachexia viroid* sequences reported at the Gen bank database and CcaVd Yuc sequences isolates in Yucatan Mexico using the Winclada program version 1.00.08.

2.4.4. Secondary structure. The lowest free-energy structure predicted for CcaVd-Yuc (Fig. 2.4) was identical to the CcaVd reported previously (17) and conserved domains as TCR and CCR CcaVd-Yu isolates had a 100% of identity sequences with CcaVd sequences reported (30).

The secondary structure predicted for CVd-I was showed in figure 2.4 keeping a 100 identity percentage with sequences reported previously.

2.5. DISCUSSION

The results obtained in this study confirmed the presence of CEVd and CcaVd in the Yucatan State, as Alvarado and coworkers (20) and Almeyda and coworkers (21) reported.

Hop stunt viroid sequences affecting citrus could be classified as cachexia inducing variant (CVd-IIb, CVd-IIc, ca-909) and non cachexia inducing variant (CVd-IIa) (17, 27, 29, 31, 32). Several Persa lime dwarfed on *Citrus macrofilia* rootstock sampled showing symptoms as steam pitting, yellowing and stunting (Fig.2.3). That's plants resulted positives to *Hop stunt viroid* (HSVd) related citrus viroid II variant (Table 2.2). However analyses of the comparison done between complete genome Ccavd sequences isolated from Yucatan and all HSVd variants showed higher identity percentage with HSVd non inducing cahexia variants. But, symptoms as steam pitting in citrus have been reported only be induced for two pathogens, *Citrus tristeza virus* and *Citrus cachexia viroid* (33, 14). But those plants resulted negatives to CTV (personal communication of CESVQROO staff) when they were tested by ELYSA suggesting that CcaVd-Yuc induced the disease.

The pathogenic activity of cachexia inducing variant is determined by six nucleotide cluster absent in non cachexia inducing variant. On the other hand an analysis more detailed of CcaVd-yuc sequences showed that six nucleotide cluster cachexia was not present (data not shown) beside a comparisons done between

CcaVd yuc and ca-909 (a variant unusual in that the six nt motif of cachexia found in all known agents of cachexia disease is absent (17, 29, 31) did not show higher identity percentage between of them than CVd-IIa.

Some combination of nucleotide changes in structural domains could be correlated with symptoms such as epinasty, stunting and vein necrosis (34). The Ccavd Yuc variants had variable nucleotide changes dispersed in some of the structural domains (Fig. 2.4), which could reflect the variation of the symptoms expressions in the citrons observed in Citrus orchard of Yucatan. Thus, CcaVd Yuc seems be a different HSVd cachexia inducing variant which is supported by phylogenetic analysis of HSVd variants in citrus (Fig. 2.5) where CcaVd Yuc isolates are grouped in separate clade suggesting that CcaVd Yuc have a distinct genetic lineage as a HSVd variant with a closer relationship to the well characterized non cachexia variant cvd-IIa than any known cachexia inducing variants. Although, we can not validly conclude that those CcaVd-Yuc isolates caused the cachexia symptoms, because the trees were infected under field conditions until biological indexing using the indicator host, Pearson special mandarin (*C. reticulata*) (17, 27) be realized to clarify whether cachexia disease is present in Yucatan Mexico. However, Vidalakis and coworkers (32) have questioned the inclusion of ca-909 variant as a cachexia disease agent beside no evidence has been presented for induction of cachexia disease symptoms in the field by ca-909 variant.

Despite the symptoms observed in sampled trees were severe bark scaling and tree stunting, characteristic of exocortis disease (14, 35), CEVd was not the most distributed viroid in the sampled locations (Fig. 2.2), because, the average CcaVd incidence (47%) in the seven citrus orchards analyzed was higher than CEVd (23%). One possible explanation is that as CcaVd was found in citrus trees grown on sour orange rootstock, which is tolerant to this viroid (2), and then no typical cachexia symptoms were observed. Other possibility is that CVds mixture other than CEVd induced symptoms as severe as those caused by CEVd, as reported in Japan (16). Similar viroid combinations were found in this work (Table 2.2).

According to PCR results Ccavd, CEVd, CVd-1, CVd- III, CVd-IV, CVd-OS, and CVd-I LSS are present in citrus orchards (Fig 2.1). Although the complete genome was not obtained to CVd-IV, CVd-OS and CVd-I LSS, the fragments obtained had 100% identity sequences with sequences reported in NCBI database. Furthermore the size PCR products always corresponded to each other viroid suggesting that results are correct. However, is necessary to have complete genome sequences of each viroid to confirm that results.

Citrus viroid Ib had identical nucleotide sequences (data not shown) to those reported in other countries (36, 37, 38) suggesting that those variant may have been imported or exported to those countries throughout citrus budwood.

The main citrus area in Yucatan is located in the South region of the state, with 75% of the cultivated citrus tree. In this area, we found the highest incidence of CEVd and CcaVd compared with the Central and the East region of the state. In some orchards located in the last two regions, no positives trees were detected for CEVd (Fig. 2.2). This should be considered, because newly established viroid-free trees are subjected to the risk of mechanical infection, during pruning and harvesting operations (activity practiced in Yucatan in almost all year) from symptomless infected trees growing on adjacent orchard or even within the same orchard. Besides those activities are made when high temperature occur (37 °C middle temperature of Yucatan), making the transmission more efficient, because trees are not dormant and contain high viroid titers (39, 40, 41). Finally the growers regularly remove dead, declining, or non productive trees in mature citrus plantings and replant with young trees, which make more difficult the management of diseases transmitted mechanically as citrus viroids.

The high incidences of CEVd and CcaVd found at the orchards and the change of citrus rootstock realized year by year (3000 ha/ year), in order to control CTV infections (2), suggest that those pathogens could be a higher problem in the future than those induced for CTV, as reported at Belize and Venezuela (6). Thus, control of CTV using resistance rootstock a CTV should reanalyzed to redesign strategies and control that pathogen without to make the citrus industry vulnerable to

Citrus viroid. On the other hand, traditional system used to cultivate habanero pepper, tomatoes within citrus orchard infected by citrus viroids as CEVd and CcaVd should be surveyed because is possible that vegetables being affected by viroids so it is important to know what is the impact of these pathogens to design strategies of managements.

The citrus specie where we found the major number of CVds was *Citrus latifolia* (Table 2.2). This is important to consider, because Mexico is the most important producers of this specie (42), and mechanical transmission of viroids could be high under high temperature conditions (31, 40), characteristic of the Yucatan state and many others regions in which citrus are grown. Thus control of CVds spread is critical in nurseries where contamination of a single tree may result in the dissemination of many plants in the field, so management strategies of citrus viroids should be reinforced in orchards, where the rootstock, the scion, or both are sensitive to viroid. For this reason, disinfection of tools used in pruning and harvesting should be mandatory in certification programs.

2.6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to many people to various facilities for contributing to the sample collection. We also thank to Lucila Sanchez Cach for technical assistance and to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for the PhD fellowship (141670) for Alberto Uc-Vázquez.

2.7. REFERENCES

1. FAO, 2005. Estadísticas Agrícolas de la Organización Mundial para la agricultura y la alimentación (FAO, por sus siglas en ingles). <http://www.fao.org>
2. M.A. Rocha-Peña, C. J. E. Padrón-Chavez, 1992. Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza. Publicación especial No.2. Campo Experimental General Terán. INIFAP. México 48 p.
3. H. O. Miao, M. Skaria, G. N. Solis, Thirteenth IOCV conference **1** (1996)
4. M. A. Rocha-Peña, C.F.M. Ochoa, J. P. Martinez-Sorriano, C. N. Roistacher, R. F. Lee, *Subtropical plant science* **50**, **26** (1998)
5. M. A. Rocha-Peña, J.P. Martinez- Sorriano, K.F. Bierly-Murphy, *Rev. Mex. Fit.* **13**, 146 (1995)
6. F. M. C. Ochoa, M. A. P. Rocha, R. F. Lee, *Rev. Mex. Fit.* **12**, 97 (1994)
7. R. Flores, C. Hernández, E. A. Martínez, A. J. Darós, F. Di Serio, *Ann. Rev. Phytopathol.* **43**, 117 (2005)
8. T. Ito, H. Leki, K. Ozaki, *Arch. Virol.* **145**, 2105 (2000)
9. R. Flores, S. Delgado, M. E. Gas, A. Carbonell, D. Molina, S. Gago, M. Peña, *FEBS Lett.* **567**, 42 (2004)
10. P. Serra, C.J. Barbosa, J.A. Darós, R. Flores, N. Duran-Vila, *Virology* **370**, 102 (2008)
11. R. Flores, J. W. Randles, M. Bar-Joseph, T. O. Diener, *Arch. Virol.* **143**, 623 (1998)
12. T. Ito, H. Leki, K. Ozaki, T. Ito, *Arch. Virol.* **146**, 975 (2001)
13. J. S. Semancik, G. Vidalakis, *Arch. Virol.* **150**, 1059 (2005)
14. C. Verniere, X. Perrier, C. Dubois, A. Dubois, L. Botella, C. Chabrier, J. M. Bové, N. Duran-Vila, *Plant Dis.* **88**, 1189 (2004)
15. N. Duran-Vila, C. N. Roistacher, R. Rivera-Bustamante, J. S. Semancik, *J. Gen. Virol.* **69**, 3069 (1988)

16. T. Ito, H. Leki, K. Ozaki, T. Iwanami, K. Nakahara, T. Hataya, T. Ito, M. Isaka, T. Kano, *Phytopathology* **92**, 542 (2002)
17. K. Reanwarakorn, J. S. Semancik, *Phytopathology* **89**, 568 (1999)
18. J. A. Sánchez-Salas, R. Robles-Serna, R. González-Garza, *Proc. Tropical Region Amer. Soc. Hort. Sci.* **23**, 75 (1979)
19. R. Robles-Serna, 1985. Presencia de Exocortis en los cítricos de Tamaulipas. Resúmenes XII Congreso Nacional de Fitopatología. Septiembre 11-14. Guanajuato México.
20. O. G. Alvarado-Gómez, J. P. Martínez-Soriano, B. Pereyra- Alférez, M. A. Rocha-Peña, *Rev. Mex. Fit.* **18**, 42 (2000)
21. H. I. Almeyda-León, M. M. Iracheta-Cárdenas, J. Jasso-Argumedo, S. A. Curti-Díaz, P. Ruiz-Beltran, M. A. Rocha-Peña, *Rev. Mex. Fit.* **20**, 152 (2002)
22. C. L. Campbell, L. V. Madden, *Introduction to plant disease epidemiology.* Jonh Wiley and Sons. New York. 512 p (1990)
23. P. Chonzinnsky, N. Sacchi, *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987)
24. M. Zuker, *Nucleic acids Res.* **31**, 3406 (2003)
25. Golobof. P. 1993. *Cladistics* **9**, 83 (1993)
26. K. C. Nixon, *Cladistics* **15**, 407 (1999)
27. R. Reanwarakorn, J.S. Semancik, *J. Gen. Virol.* **79**, 3163 (1998)
28. T. Ito, T. Furuta, T. Ito, M. Isaka, Y. Ide, J. Kaneyoshi, *J. Gen. Plant Pathol.* **72**, 378 (2006)
29. A. Palacio-Bielsa, J. Romero-Durbán, N. Durán-Vila, *Arch. Virol.* **149**, 537 (2004)
30. R. Flores, F. Di serio, C. Hernández, *Semin. Virol.* **8**, 65 (1997)
31. A. Palacio, N. Duran-Vila, Fourteenth IOCV Conference 273 (2000)
32. G. Vidalakis, J. Z. Davis, Semancik, J. S. *Ann. Appl. Biol.* **146**, 449 (2005)
33. C. N. Roistacher. *Graft transmissible diseases of citrus handbook for detection and diagnosis.* FAO. Roma, Italy. 286 p. (1995)
34. T. Sano, T. Candresse, R. W. Hammond, T. O. Diener, R. A. Owens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10104 (1992)

35. C. Verniere, X. Perrier, C. Dubois, A. Dubois, L. Botella, C. Chabrier, J. M. Bové, N. Duran-Vila, *Phytopathology* **96**, 356 (2006)
36. T. Hataya, K. Nakahara, T. Ohara, H. Ieki, T. Kano, *Arch. Virol.* **143**, 971 (1998)
37. X. Foissac, N. Duran-Vila, *Arch. Virol.* **145**, 1975 (2000)
38. M. Gandía, N. Duran-Vila, *Arch. Virol.* **149**, 407 (2004)
39. J. C. Barbosa, A. J. Pina, J. P. Pérez, L. Bernard, P. Serra, L. Navarro, N. Duran-Vila, *Plant Dis.* **89**, 749 (2005)
40. S. M. Garnsey, D. L. Zies, M. Irely, P. J. Sieburth, J.S. Semancik, L. Levy, M. E. Hilf, Fifteenth IOCV Conference 219 (2002)
41. D. Skoric, M. Conerly, J. A. Szychowski, J. S. Semancik, *Virology* **280**, 115 (2001)
42. Curti, D. S., Loredo, S. X., Díaz, Z. U., Sandoval, R. J. A. y Hernández, A. J. 2000. Tecnología para producir limón persa. INIFAP-CIRGOC. Campo experimental Ixtacuaco. Libro técnico. No. 8. Veracruz, México. 144p.

CAPITULO 3

Molecular characterization of a population of Citrus Exocortis Viroid-Low sequence similarity (CEVd-LSS), a tentative new citrus viroid isolated in citrus species in Yucatan, Mexico*

¹Alberto Uc-Varguez, Yereni Minero García and Oscar A. Moreno-Valenzuela

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatan A.C., Merida, Yucatan, Mexico. Telephone: +52(999)9428330; Fax: +52(999)9813900. Email: ucalber@yahoo.com.mx; oamv@cicy.mx

Keywords: citrus viroids, phylogenetic analysis, secondary structure, genetic diversity.

* This chapter was sent to publish in Virus Genes

3.1. ABSTRACT

Total RNA was isolated from different citrus species in Yucatan Mexico. Using specific primers to *Citrus exocortis viroid* (CEVd), 16 variants were isolated consisting of 394 to 399 nucleotides. Sequence analysis showed that the variants share 94.2 to 99.7 % identity among themselves, as well as with a putative CEVd sequence reported in Egypt. They had low identity percentage (40 to 47 %) with other citrus viroid species, including CEVd. Phylogenetic analysis grouped the sixteen sequences from Yucatan in a clade separate from CEVd sequences reported in NCBI GenBank database. The differences observed in the CEVd-Yuc isolates, including the branched secondary structure, and differences found in the conserved domains suggest us that CEVd-Yuc should be considered as a new citrus viroid species. This viroid induces asymptomatic infection when inoculated in tomato, pepper, sour orange and Rangpur lime. The name proposed for this tentative new citrus viroid species is *Citrus exocortis viroid* low sequence similarity (CEVd-LSS).

3.2. INTRODUCTION

Viroids are the smallest plant pathogens and consist of unencapsidated, circular and single strand RNA ranging in size from 246 to 463 nucleotides (1). Viroids have been classified into two families, *Pospiviroidae*, composed of species with a central conserved region (CCR) and no hammerhead ribozymes, and *Avsunviroidae*, composed of species lacking a CCR, but able to self-cleave in both polarity strands through hammerhead ribozymes (2).

Based on electrophoretic mobility, sequence identity, host range and symptom expression in Etrog citron (*Citrus medica*) (3), citrus viroids have been grouped into five species: *Citrus exocortis viroid* (CEVd), *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus viroid III* (CVd-III), and *Citrus viroid IV* (CVd-IV) (4) beside, *Citrus viroid* original sample (CVd-OS) and *Citrus viroid I-Less* sequence similarity (CEVd-I LSS) and *Citrus viroid V* have been proposed as a sixth, seventh and eighth species (5, 6, 7). All citrus viroid species infect citrus trees grafted on trifoliate orange (*Poncirus trifoliata*) rootstock (8, 3). Some strains induce symptoms in the host, while others do not; CEVd causes bark scaling and stunting on citrus tree grafted on trifoliate orange rootstock (8).

Nucleotide sequence analysis of CEVd has shown that most of its variants share more than 90 % sequence identity, although a few have less than 90 % (9). The secondary structure of CEVd, as well as all the pospiviroid species, is a highly base-paired, rod-like structure in which short base-paired regions alternate with mismatched internal loops (2). In the present study, molecular characterization demonstrated that a new population of citrus viroid variants from Yucatan State, Mexico, has only 45 % sequence similarity with CEVd, and 95-98% similarity among each other. The new variants exhibited differences in the secondary structure of the conserved domain and were grouped in a monophyletic clade separate from CEVd. This suggests that these variants constitute a new citrus viroid species, and the name *Citrus exocortis viroid* low sequence similarity (CEVd-LSS) is proposed.

3.3. MATERIALS AND METHODS

3.3.1. Molecular characterization

3.3.2. Viroid sources. Plant samples used in this study were collected from seven commercial orchards (Kinchil, Samahil, Ticul, Oxkutzcab, Dzan, San Francisco and Espita) in Yucatan State, Mexico. A total of 387 trees, either symptomatic or asymptomatic, were sampled, including *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus reticulata*, *Citrus limon*, *Citrus latifolia*, *Citrus aurantifolia* and *Citrus grandis* on rootstocks of *Citrus aurantium*, *Citrus macrophila*, *Citrus volkameriana* or *Poncirus trifoliata*. Four shoots were taken from each sampled tree, and all samples stored at -20 °C until processing.

3.3.3. Nucleic acids extraction and viroid amplification. Plant samples (0.2 g) were homogenized in 1 ml of extraction buffer (Trizol, Invitrogen), as described by Chonszinky and Sacchi (10). Following Alvarado and co-worker's method (11), full-length, double-strand viroid cDNA was synthesized by RT-PCR using the oligonucleotides 5'-CCCTGAAGGACTTCTTCCCC-3', complementary to 71-90, and 5'-ATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAG-3', homologous to 91-114 nucleotides; these were designed to amplify the complete CEVd genome (12). MMLV reverse transcriptase (Ambion) and Red Taq polymerase (Biolase Red™ DNA Polymerase, Bionline) were used for all amplifications. Second strand synthesis and viroid amplification were done using 2 µl of cDNA. PCR products were analyzed in a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized with photodocumentation equipment (Kodak EDAS 290).

3.3.4. Cloning and Sequencing. RT-PCR products were purified from the agarose gel using the Qiaex II kit, following manufacturer instructions (Qiagen). The purified viroid genome was then cloned in pGEM T-Easy vector according to manufacturer instructions (PROMEGA), and the cloned fragments were sent to Macrogen Inc. (Korea) for sequencing.

3.3.5. Sequence analysis. Sequences were manually edited using EditSeq (DNASTAR ver. 5.08 Madison, USA) to remove vector fragments. The resulting sequences were compared using BLAST to determine each sequence's preliminary identification. Sequence identity percentage was confirmed by analyzing and comparing the complete genome sequence isolates from Yucatan (CEVd-Yuc) with all the Citrus exocortis viroid sequences reported in GenBank database. This was done using the MegAlign (DNASTAR ver. 5.08 Madison, USA) program and ICTV criteria, that is, pair sequences sharing $\geq 90\%$ identity constitute the same viroid species (13).

Genetic diversity at synonymous positions was estimated using the Kimura 2 parameter model including in the MEGA 4 Software (14).

Sequences of the viroids conserved domains of CEVd-Yuc isolates were compared using alignment in the MEGA 4 Software (14), including a CEVd sequence isolated from Egypt (CEVd Egypt) (AY513268 accession number) and a CEVd sequence (AF298177 accession number) reported in NCBI database.

3.3.6. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of the full-length viroid sequences was done using the NONA ver. 2.0 (15) and WinClada ver. 1.08.00 (16) programs. The cladogram was built using the CEVd sequences identified here (CEVd-Yuc) and 78 CEVd sequences obtained from the NCBI GenBank database (1. AY513268, 2. AY671957, 3. AY671956, 4. AY671955, 5. AY671954, 6. AY671953, 7. AY671952, 8. AY372393, 9. AY372391, 10. AY372390, 11. AY523584, 12. AY523583, 13.

AY523582, 14. AY514447, 15. AY514446, 16. AY514445, 17. AY514444, 18. AY517496, 19. AY517495, 20. AY517494, 21. NC 001464, 22. AY456136, 23. AF540963, 24. AF540962, 25. AF540961, 26. AF540960, 27. AJ564803, 28. AJ564802, 29. AJ564801, 30. AJ564800, 31. AJ564799, 32. AJ564798, 33. AJ564797, 34. AJ564796, 35. AJ564795, 36. AY229990, 37. AJ490825, 38. AB054599, 39. AB054598, 40. AB054597, 41. AB054596, 42. AB054595, 43. AB054594, 44. AB054593, 45. AB054592, 46. AF458776, 47. AF458775, 48. AF458772, 49. AF458771, 50. AF434678, 51. AF428064, 52. AF428063, 53. AF428062, 54. AF428061, 55. AF428060, 56. AF428059, 57. AF428058, 58. AF148717, 59. S79831, 60. S67442, 61. S67446, 62. S67441, 63. S67440, 64. S67438, 65. S67437, 66. X53716, 67. U21126, 68. M30870, 69. M30869, 70. M30871, 71. M30868, 72. M34917, 73. K00965, 74. K00964, 75. J02053, 76. Y00328, 77. AF298178, 78. AF298177). Several searches were performed using the Parsimony Ratchet algorithm, with 200 iterations per search and a single tree was held per iteration. No informative characters were deactivated to optimize tree statistics. The consistence index (CI) and retention index (RI) were applied to determine data 'goodness of fit' in the resulting phylogenetic trees. A strict consensus tree was then reconstructed using Winclada program, and statistical support for each major clade estimated using 1000 iterations of the jackknife algorithm. The consensus tree built for the CEVd-Yuc sequences was rooted with a *Citrus cachexia viroid* sequence (HX19945 accession number) corresponding to a Hostuviroid species from a genera in the *Pospiviroidae* family (17).

3.3.7. Secondary structure

Secondary structure of the CEVd-Yuc sequences was predicted using a folding temperature of 25 °C, with the Zuker-Turner *mfold* RNA folding package ver. 3.2. (18) (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>). The Circular ver. 2.3. (<http://mfold2.wustl.edu/~mfold/rna/form-2.3.cgi>) program was also used because it allows for folding temperature to be changed.

3.3.8. Plant inoculation

PCR products were amplified from pGEM T-Easy plasmid containing the viroid genome, purified from agarose gel and dissolved in 0.1 M phosphate buffer at pH 7.0. One hundred ng of the PCR product was mechanically inoculated (rubbing the leaves dusted with Celite) into five plants each of *Citrus aurantium*, *Citrus limonia*, *Solanum esculentum* and *Capsicum annum* (19, 20).

3.4. RESULTS

3.4.1. Molecular characterization

Sixteen viroid sequence isolates related to *Citrus exocortis viroid* were obtained from the samples collected from Yucatan, Mexico. These sequences (CEVd-Yuc) were isolated from *Citrus sinensis* (8 isolates), *Citrus grandis* (5 isolates) and *Citrus latifolia* (3 isolates). Nucleotide sequence analysis showed the CEVd-Yuc sequences to range from 394 to 396 nt in size (Table 3.1).

Table 3.1. Accession number, size and identity percentage of the five *Citrus exocortis viroid* low sequence similarity (CEVd LSS) compared with four *Citrus exocortis viroid* sequences reported in NCBI database.

CEVd-LSS	Size (bp)	*AY513268	AY671957	AY671954	AY671952
DQ318790	395	89.9	37.2	37.7	37.5
DQ318791	394	94.9	40.1	40.6	40.1
DQ318792	394	93.7	39.3	39.8	39.3
DQ318793	395	93.4	39.2	39.7	39.2
DQ318794	394	94.7	39.8	40.4	39.8

*Sequences reported in NCBI database.

The CEVd-Yuc isolates consisted of 23.35% of A, 21.32% of T, 25.38% of C and 29.95% of G residues. Total G+C content was 55.33%, which is 4% less in the CEVd-Yuc isolates compared to the CEVd sequences (Table 3.2).

Table 3.2. Nucleotide composition of *Citrus exocortis viroid* low sequence similarity (CEVd LSS) sequences compared among two *Citrus exocortis viroid* (CEVd) sequences reported in NCBI database.

CEVd	%A	%G	%T	%C	A+T%	C+G%
DQ318790	23.35	29.95	21.32	25.38	44.67	55.33
DQ318791	23.35	29.95	21.32	25.38	44.67	55.33
DQ318792	22.84	29.44	21.32	24.87	44.16	54.31
DQ318793	23.29	29.11	21.27	24.81	44.56	53.92
DQ318794	23.35	29.95	21.32	25.13	44.67	55.08
*AY513268	23.26	29.72	21.19	25.58	44.44	55.30
*AF298177	18.87	29.38	21.83	29.92	40.70	59.30

* Accession number of CEVd Sequences reported in NCBI database.

Compared to the CEVd-Egypt isolate (AY513268), and a previously reported CEVd sequence (X53716 accession number) (21), the CEVd-Yuc had several modifications along the entire viroid genome, including transition, transversion, insertion and deletion. The 5' and 3' ends were identical in all the analyzed sequences, with the exception of a U insertion in the 5' end of three of the CEVd-Yuc (Fig. 3.1).

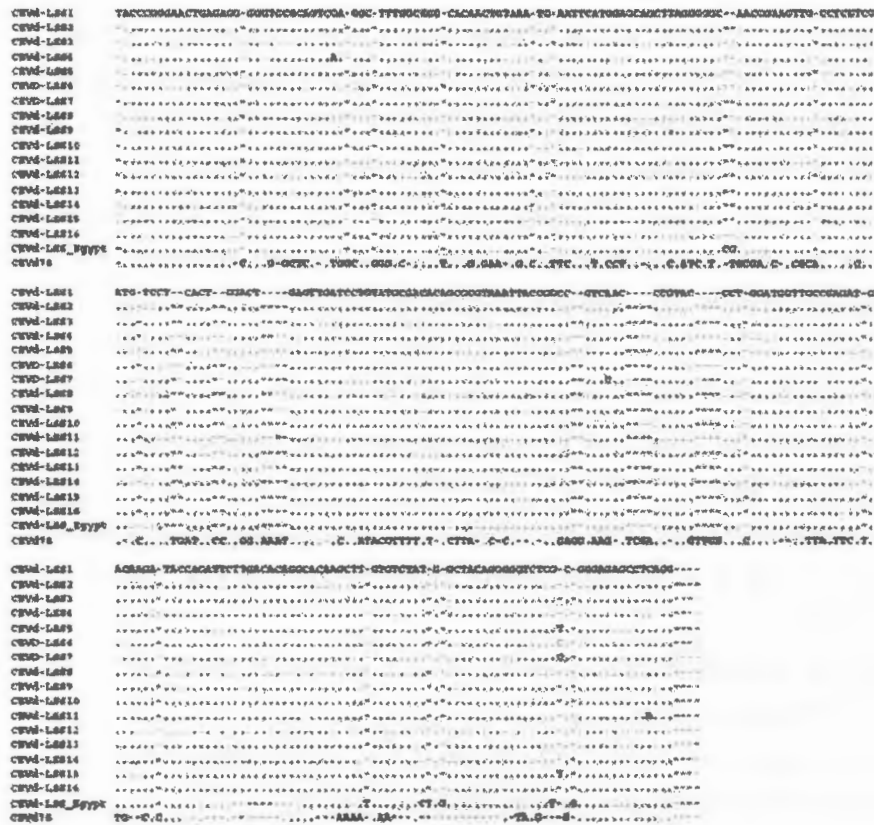


Figure 3.1. Nucleotide sequences alignment of the sixteen *Citrus exocortis* viroid low sequence similarity (CEVd LSS) isolated from Yucatan, and two *Citrus exocortis* viroid (CEVd-Egypt, AF298177, and CEVd 78, AY513268), reported in NCBI database.

Unlike the CEVd-Yuc, the CEVd-Egypt isolate had a 12-nt deletion at position 310. The CEVd-78 (AF298177 accession number) differed most from all other analyzed sequences. In general, the sixteen CEVd-Yuc sequences differed by one to five deletions or exchanges (Fig. 3.1). Five sequences of CEVd-Yuc isolates were deposited in the NCBI GenBank database (Table 3.1).

Complete genome sequence analysis of the CEVd-Yuc isolates showed them to have 94.2 to 99.7 % identity percentage between themselves, and 90 to 95 % with one sequence reported in the GenBank database (AY513268), isolated in Egypt (Table 3.1). In contrast, the CEVd-Yuc isolates exhibited low identity percentages (40-45 %) with previously reported CEVd sequences (Table 3.1) (21, 22, 23). Based on these identity percentages, we believe the CEVd-Yuc isolates represent a new viroid species and therefore we propose that this species be tentatively named as *Citrus exocortis viroid*-low sequence similarity (CEVd-LSS).

Sequence similarity comparison was done for five structural domains (24) of the CEVd (X53716) (21) and CEVd-LSS (DQ318790). This showed that there is 50 % identity between them in the left terminal domain, 50 % in the higher strand of the pathogenicity domain, and 61.2 % in the lower strand of the pathogenicity domain. Identity in the higher strand of the CCR was 58.6 % and for the lower strand was 75.5 %. In the variable region, similarity between the two viroids was 44.4 % in the higher strand and 42.8 % in the lower strand; finally similarity in the right terminal domain was 49.2 %.

Sequence analysis showed that CEVd-LSS sequences contain six AUG initiation codons. However, three to four open reading frames were identified in the CEVd-LSS (size range among 81 to 222 nt), and their tentative amino acids residue numbers ranged from 27 to 78 amino acids (Table 3.3).

Table 3.3. Potential polypeptide translation products of *Citrus exocortis viroid* Low sequence similarity (CEVd-LSS), positions of start and stop codons and length of products.

Sequence isolate	Start codons		Stop codons			*Polypeptide product (amino acids residues)
	AUG	GUC	UAA	UAG	UGA	
AO6141	82				174	28
	171		392			74
	219		392			58
	288		392			35
AO7142	31				174	38
	82				174	31
	94				174	27
F1211	32				175	38
	83				175	31
	95				175	27

*Residue numbers are at the first residue of the start to stop codon. The residue number is not retained in the minus strand.

Genetic diversity analysis between the isolated CEVd-LSS sequences, as well as the CEVd-Egypt, showed genetic distances at synonymous positions to range from 0 to 0.019. Maximum genetic distance values were recorded between the CEVd-Egypt and the CEVd-LSS isolates. Mean nucleotide diversity at synonymous positions for the entire population was 0.003.

3.4.2. Secondary structure

Secondary structure analysis (18) of the CEVd-LSS isolates identified four isolates that form cruciform structures, including two to four branches, and various

hairpin loops and internal loops. The remaining twelve isolates exhibited five to nine branches, but without structures resembling cruciform tRNA-like structures (Fig. 3.2). Therefore, all the CEVd-LSS sequences had branches in the secondary structure, as reported for the *Avsunviroidae* family, and some sequences related to the conserved hammerhead ribozymes domain were identified, although this structure was not observed (Fig. 3.2).

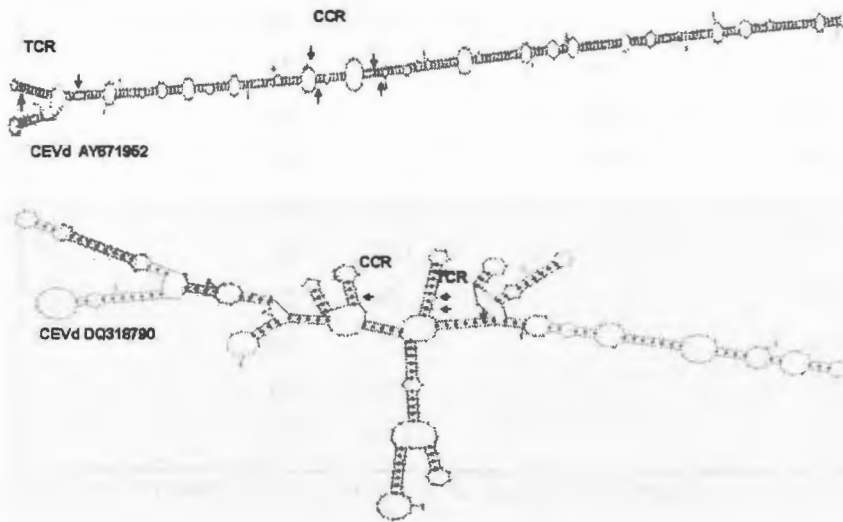


Figure 3.2 Proposed secondary structure of minimum free energy of CEVd (AY671952) and CEVd-LSS (DQ318790). Conserved regions (CCR and TCR) in members of the genus *Pospiviroid* are marked. The blue arrow points represent Terminal conserved region, and the red arrows points represent Central conserved region.

The CEVd-LSS and CEVd-Egypt isolates exhibited some differences in the two conserved domains, Terminal conserved right (TCR), and Conserved central region (CCR) of the Pospiviroid group when compared to CEVds reported previously (21, 22). In the TCR, the CEVd-LSS isolates had five nucleotide changes (CNNGNGGAAAGGUGGG) versus the Pospiviroid sequence (CNNGNGGUUCCUGUGG) (Fig. 3.1) (22, 25). The high chain of the secondary structure in the CCR, CEVd-LSS was 100 % similar to the CEVd, but the lower chain contained 16 nucleotide changes (underlined here) (CACUAGUGCCACAAAGGCUUUUGGUGG) when compared to the Pospiviroid sequences (UCGAAGUCAACAAAGGUGGCCCAUCA) (Fig. 3.1) (25).

3.4.3. CEVd-LSS symptomatology

Citrus, tomato and pepper plants inoculated with CEVd-LSS were asymptomatic 60 days after inoculation, although all inoculated plants were positives for CEVd-LSS when they were analyzed by RT-PCR (Data not shown).

3.4.4. Phylogenetic analysis

Phylogenetic analysis of the CEVd-LSS sequences yielded 36 most parsimonious trees (MPT) with 512 steps, a consistence index (CI) of 0.72 and a retention index (RI) of 0.96. The out-group was CVd-II (HX19945 accession number), and the analysis included 95 taxa with 469 characters and a total of 140 informative sites. A strict consensus tree resulted (Fig. 3.3), with two major clades, one containing the CEVd-LSS sequences (including CEVd-Egypt) arranged in a ladder-like structure, and a second clade including the CEVd sequences arranged in four groups. This analysis was strongly supported by jackknife analysis (100 %) (Fig. 3.3).

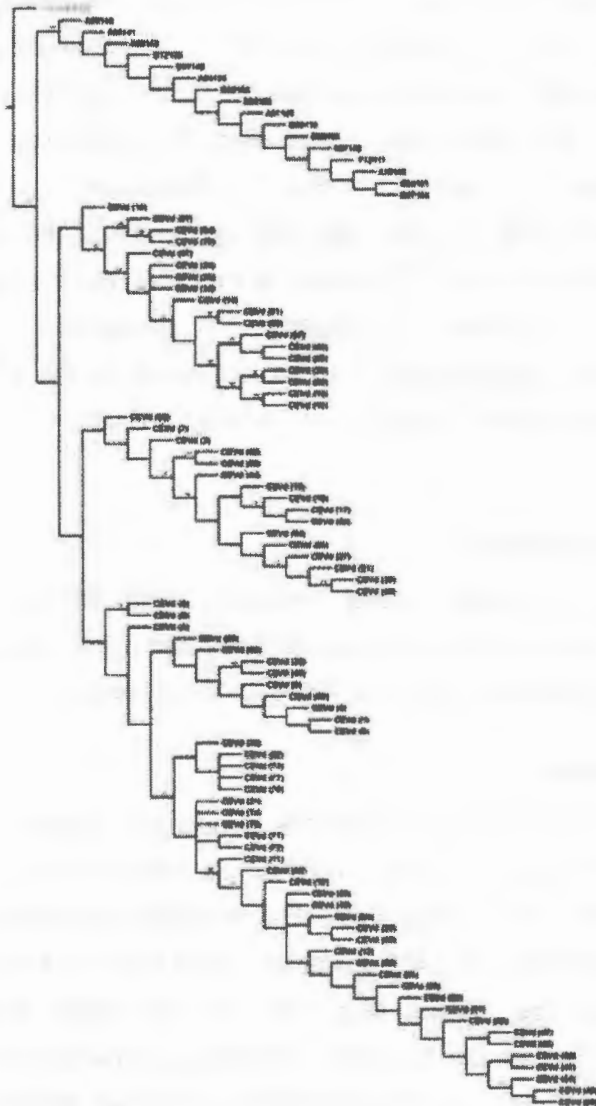


Figure 3.3. Sequence-inferred phylogenetic relationships of CEVd-LSS and CEVd; the single most parsimonious tree is presented. Numbers above the major nodes represent jackknife values > 70% (1000 iterations). CVd-II (HX19945 accession number) was used as out-group.

3.5. DISCUSSION

The CEVd-LSS sequences ranged in size from 394 to 396 nt (Table 3.1), that is, 20 nt longer than previously reported CEVd sequences (371-375 nt) (26, 27, 28). These differences, however, were not caused by duplications of the molecule's right terminal region, as was reported for CEVd-92 (29), CEVd-87 and CEVd-76; the latter two are the apparent result of a specific host and prolonged infection (23).

Sequence analysis showed that the sixteen CEVd-LSS sequences share 94.2 to 99.7 % identity (Table 3.1), whereas they share only 41.7 % with CEVd sequences reported in the NCBI GenBank database (Table 3.1). International Committee for Taxonomy of Viruses (ICTV) criteria establish that if a pair of sequences share 90% or higher identity, they are considered to be the same viroid species, but if the identity percentage is less than 90% should be considered as a new species (13). According to these criteria, the CEVd-Yuc isolates constitute a new viroid species, for which we propose the tentative name of *Citrus exocortis viroid-low sequence similarity* (CEVd-LSS).

In the primary structure, the 5' and 3' ends of the CEVd-LSS and CEVd sequence (accession number AF298177) were identical (Fig. 3.1) (27), which explains why the specific CEVd primer pair could amplify CEVd-LSS isolates, despite the low sequence similarity between them, beside CEVd primers were designed based on the sequence of the Central domain region upper strand (12), which is a region without variability (Fig. 3.1) sequence suggesting that they could have a common ancestor. The conserved domains of the CEVd-LSS and CEVd sequences (21) shared higher identity percentages (59% to 76%) than the complete genome (41.7%), meaning that the observed variability may have originated in an extended period of infection and by host effect. Alignment of the 78 reported CEVd sequences (GenBank) showed them to have a similarity percentage of 87-100% (data not shown); some of them have similarities slightly lower than 90%, but are considered the same species (21, 9). The low sequence similarity between CEVd-LSS and

CEVd (41.7%), however, strongly suggests that they are different species. CEVd and CEVd-LSS also differ in terms of size, with CEVd being 371 nt in size, and CEVd-LSS ranging from 394 to 395 nt (CEVd-Egypt is also within this range).

The CEVd-LSS secondary structures consisted of branch and cruciform structures (Fig. 3.2) different from the rod-like secondary structures reported for CEVd (21, 27). This may be due to the low sequence similarity between the complete CEVd-LSS and CEVd genomes. However, one CEVd sequence isolate described with a cruciform structure, involving 80 nucleotides at the left terminal domain (30), had no sequence similarity with CEVd-LSS. The branched secondary structure observed in the CEVd-LSS isolates (Fig. 3.2), suggests that this viroid may belong to the *Avsunviroidae* family, considering that the most prominent characteristic of this viroid family is the presence of hammerhead ribozymes (31, 32). Furthermore, thirteen conserved ribozyme region nucleotides were identified in the CEVd-LSS genome, although no hammerhead structure was observed, perhaps due to each sequence's position within the viroid genome.

The CCR is the functional domain for processing of the viroid genome (33, 34) and contains two sets of conserved nucleotides flanked by an inverted repeat in the upper strand (24). In CEVd-LSS, the CCR lower strand had 16 modified nucleotides (Fig. 3.1), which led us to hypothesize that CEVd-LSS populations might not be able to replicate. This was not supported by the CEVd-LSS inoculation results in *Citrus aurantium*, *Citrus limonia*, *Solanum lycopersicon* and *Capsicum annum*, in which the viroid effectively replicated. This may have occurred in CEVd-LSS because the pospiviroid hairpin loop I (HPI), formed by the high strand CCR sequences and inverted repeat sequences (35, 36), was found with almost 100% of identity, interchanging only two nucleotides in the helix hairpin I (Fig. 3.1). This structure is known to be involved in the oligonucleotide intermediates processing of viroids (35, 36), besides the GAAA tetraloop which is part of the Loop E motif, is the functional domain for viroid processing (33, 37). Thus, the CEVd-LSS sequences have the functional domain basics necessary for genome processing.

On the other hand, Hairpin II (HP II) formed for the lower strand CCR sequences (38), (which has 16 modified nucleotides in CEVd-LSS) is known to be involved in viroid infectivity and its replication (39, 40, 41). Candresse and co-workers (40) demonstrated that some distant members of the Pospiviroid family, such as CLVd, do not have a complete base pairing in the HP II structure, which indicates that the integrity of this structure may not be crucial to these viroids. This may explain why CEVd-LSS asymptomatically infected the inoculated plants. This asymptomatic infection may also be due to cultivation temperature (tested plants grown at 28-30 °C in the present study), as Skoric *et al.* (28), showed that a mild CEVd variant infecting *Gynura aurantiaca* caused only mild symptoms at 24 °C but induced a severe reaction at 40 °C. In this case, variability in symptom expression was apparently associated with a specific temperature-sensitive response in *Gynura aurantiaca* (28).

The three to four open reading frames located in CEVd-LSS (Table 3.3) are unlikely to encode for any functional polypeptide products. This is consistent with the lack of conservation among possible translation products of the plus and minus strands of closely related CEVd viroids (36, 42). Symons (43) reported however, conservation among possible translation products of both strands of *Avocado sunblotch viroid*, although no viroid has yet been identified to encode protein products.

Genetic distances at synonymous positions between the CEVd-LSS isolates, including CEVd-Egypt, ranged from 0 to 0.019, with maximum values between CEVd-Egypt and all CEVd-LSS isolates. This indicated that nucleotide diversity between different isolates (inter isolate nucleotide diversity among CEVd-LSS and CEVd-Egypt isolates) was greater than within isolates (intra isolates diversity among the CEVd-LSS isolates). Mean nucleotide diversity at synonymous positions for the entire examined CEVd-LSS population was 0.003, which is similar to that reported for CEVd (22), and close to the diversity generated by polymerase error (0.0020) in RT-PCR reactions (44). The genetic diversity observed here is predicted by the quasi-species model for a RNA virus (45), and can be attributed mainly to the

combined effects of the high replication error frequency of the RNA polymerase and selection pressure (44, 45).

Phylogenetic analysis of the complete genome sequences of the CEVd-LSS isolates showed that the CEVd and CEVd-LSS sequences formed two clades: one containing the CEVd-LSS sequences and CEVd-Egypt (AY513268); and the second clade included all the CEVd sequences (Fig. 3.3). The fact that the CEVd-LSS sequences form a clade completely separate from the CEVd sequences strongly suggests that the CEVd-LSS have a different evolutionary history. This is firmly supported by the result in the identity percentage in the alignment of complete genome, phylogenetic analysis, secondary structure determination, conserved domain sequences identification and *in vivo* infectivity assay done here. In conclusion, we suggest that CEVd-LSS is a tentative new citrus viroid species infecting different citrus species in Yucatan, Mexico.

3.6. ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Ricardo Alvarez and Luis Cetina for donating the citrus seeds used in this work, and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for the PhD fellowship (141670) for Alberto Uc-Vázquez.

3.7. REFERENCES

1. J. A. Darós, J. F. Marcos, C. Hernandez, R. Flores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **91**, 12813 (1994)
2. R. Flores, C. Hernandez, A. E. Martinez, J. A. Darós, F. Di Serio, Annu. Rev. Phytopathol. **43**, 117 (2005)
3. N. Duran-Vila, C. N. Roistacher, R. Rivera-Bustamante, J. S. Semancik, J. Gen. Virol. **69**, 3069 (1988)
4. R. Flores, S. Delgado, M. E. Gas, A. Carbonell, D. Molina, S. Gago, M. Peña, FEBS Lett. **567**, 42 (2004)
5. P. Serra, C. J. Barbosa, J. A. Darós, R. Flores, N. Duran-Vila, Virology **370**, 102 (2008)
6. T. Ito, H. Leki, K. Ozaki, Arch. Virol. **145**, 2105 (2000)
7. T. Ito, H. Leki, K. Ozaki, T. Ito, Arch. Virol. **146**, 975 (2001)
8. C. Verniere, X. Perrier, C. Dubois, A. Dubois, L. Botella, C. Chabrier, J. M. Bové, N. Duran-Vila, Plant Dis. **88**, 1189 (2004)
9. A. Ben-Shaul, Y. Guang, N. Mogilner, R. Hadas, M. Mawassi, R. Gafny, M. Bar-Joseph, Phytopathology **85**, 359 (1995)
10. P. Chonzinnsky, N. Sacchi, Anal. Biochem. **162**, 156 (1987)
11. O. G. Alvarado-Gómez, J. P. Martinez-Soriano, B. Pereyra- Alférez, M. A. Rocha-Peña, Rev. Mex. Fit. **18**, 42 (2000)
12. L. Levy, A. Hadidi, S. M. Garnsey, Proc. Int. Soc. Citriculture **2**, 800 (1992)
13. R. Flores, J. W. Randles, M. Bar-Joseph, T. O. Diener, Arch. Virol. **143**, 623 (1998)
14. S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, Briefings in Bioinformatics **5**, 150 (2004)
15. P. Goloboff, Cladistic **9**, 83 (1993)
16. K. C. Nixon, Cladistics **15**, 407 (1999)
17. K. Reanwarakorn, J. S. Semancik, Phytopathology **89**, 568 (1999)
18. M. Zuker, Nucleic acids Res. **31**, 3406 (2003)

19. Y. Qi, B. Ding, *The Plant Cell* **15**, 1360 (2003)
20. C. N. Roistacher ed. *Graft transmissible diseases of citrus handbook for detection and diagnosis*. FAO. Roma, Italy. 286 p. (1995)
21. M. D. Mishra, R. W. Hammond, R. A. Owens, D. R. Smith, T. O. Diener, *J. Gen. Virol.* **72**, 1781 (1991)
22. M. Gandía, L. Rubio, A. Palacio, N. Duran-Vila, *Arch. Virol.* **150**, 1945 (2005)
23. J. A. Szychowski, G. Vidalakis, J. S. Semancik, *J. Gen. Virol.* **86**, 473 (2005)
24. P. Keese, R. H. Symons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**, 4582 (1985)
25. R. Flores, F. Di serio, C. Hernández, *Semin. Virol.* **8**, 65 (1997)
26. C. Fagoaga, N. Durán-Vila, *Plant Pathol.* **45**, 45 (1996)
27. J. E. Visvader, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **13**, 2907 (1985)
28. D. Skoric, M. Conerly, J. A. Szychowski, J. S. Semancik, *Virology* **280**, 115 (2001)
29. J. S. Semancik, J. A. Szychowski, G. A. Rakowski, R. H. Symons, *J. Gen. Virol.* **75**, 727 (1994)
30. F. Bussiere, D. Lafontaine, J. P. Perrault, *Nucleic Acids Res.* **24**, 1793 (1996)
31. B. Navarro, R. Flores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 11262 (1997)
32. R. Flores, A. J. Navarro, M. Peña, B. Navarro, S. Ambros, A. Vera, *Biol. Chem.* **380**, 849 (1999)
33. T. Baumstark, A. R.W. Schroder, D. Riesner, *EMBO J.* **16**, 599 (1997)
34. T. Sano, A. Ishiguro, *Virology* **240**, 238 (1998)
35. T. O. Diener, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**, 58 (1986)
36. J. E. Visvader, A. C. Foster, R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **13**, 5843 (1985)
37. O. Shradler, T. Baumstark, D. Riesner, *Nucleic Acids Res.* **31**, 988 (2003)
38. F. Qu, C. Heinrich, P. Loss, G. Steger, P. Tien, D. Riesner, *EMBO J.* **12**, 2129 (1993)
39. P. Loss, M. Schmitz, G. Steger, D. Riesner, *EMBO J.* **10**, 719 (1991)
40. T. Candresse, A. Gora- Sochacka, W. Zagorski, *Virus Res.* **75**, 29 (2001)
41. H. R. Hammond, A. R. Owens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 3967 (1987)

42. J. E. Visvader, R. A. Gould, E. G. Bruening, R. H. Symons, *FEBS Lett.* **137**, 288 (1982)
43. R. H. Symons, *Nucleic Acids Res.* **9**, 6527 (1987)
44. A. M. Bracho, A. Moya, E. Barrio, *J. Gen. Virol.* **79**, 2921 (1998)
45. M. Eigen, *Gene* **135**, 37 (1993)

CAPITULO 4

Genes expresados diferencialmente en cítricos susceptibles y tolerantes a *Citrus cachexia viroid*

¹Alberto Uc-Varguez y Oscar A. Moreno-Valenzuela*

4.1. RESUMEN

A partir de semilla de naranjo agrio (tolerantes al CcaVd) y lima rangpur (susceptible al CcaVd) certificada libre de patógenos, germinadas bajo condiciones *in vitro*, se obtuvieron plántulas de las dos especies, las cuales fueron inoculados en forma mecánica con 100 ng de ADNc de CacVd. Posteriormente, se colectaron muestras de tres plantas a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 45 días después de la inoculación. Como testigos, se utilizaron tres plantas de cada especie inoculadas con amortiguador de fosfatos y tres plantas sin inocular. Se extrajo ARN total y se sintetizó el ADNc de cada una las muestras. Se hizo por especie, una mezcla de ADNc con muestras de cada fecha de colecta, obteniendo un total de 9 mezclas, tres de las cuales fueron de plantas inoculadas con el CcaVd, tres inoculadas con buffer y tres sin inocular. A partir de estas 9 mezclas se realizó el despliegue diferencial con 15 combinaciones de oligos para cada especie. Se obtuvo un total de 7 fragmentos amplificados que por su intensidad nos sugiere que incrementaron su expresión, 4 disminuyeron, 16 se apagaron y 18 se encendieron en lima rangpur. Mientras que en naranjo agrio, se observó que 5 de las bandas disminuyeron su expresión, 20 se apagaron y 8 se encendieron.

4.2. INTRODUCCIÓN

Los viroides son los patógenos infecciosos mas pequeños conocidos hasta el momento induciendo enfermedades en las plantas silvestres y cultivadas (Diener, 1987; Fagoaga y Duran, 1996). Los viroides están compuestos por ARN de cadena sencilla y circular, sin cubierta proteica y no sintetizan proteínas (Diener, 1987). Sin embargo, se replican de manera autónoma (a diferencia de los virus satélite que requieren del virus "helper") y se mueven en forma sistémica en las plantas infectadas, lo cual sugiere que el genoma del viroide debe interactuar directamente con factores del hospedante para realizar todas sus actividades mencionadas anteriormente (Flores *et al.*, 2005).

Las alteraciones morfológicas y citológicas que provocan los viroides en su hospedante han sido descritas hace ya varios años (Moreshet *et al.*, 1998; El Shafy *et al.*, 1971). A nivel molecular las alteraciones inducidas por viroides son la acumulación diferencial de proteínas PR y ARNm en plantas infectadas y de otros compuestos como ácido gentísico en tomate (*Solanum lycopersicom*) (Belles *et al.*, 1999), proteínas tipo osmotina (proteína PR ubicada dentro del grupo PR-5) en tomate y tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Medrano *et al.*, 1992) y disminución del nivel de putrescina libre en tomate y *Gynura aurantiaca* (Belles *et al.*, 1991; Belles *et al.*, 1993). Algunos viroides inducen una disminución en el nivel de transcritos del gen que codifica la giberelina oxidasa 20 (Vidal *et al.*, 2003), otros inducen el incremento en la expresión del gen de una proteína cinasa (Hammond y Zhao, 2000) y de varios genes PR en tomate (Itaya *et al.*, 2002). Wang y colaboradores (2004) sugirieron que el mecanismo de patogenicidad de los viroides es vía silenciamiento postranscripcional de genes de importancia para la planta, lo cual podría explicar las alteraciones mencionadas anteriormente.

Considerando las evidencias citadas anteriormente, así como otros factores como: la importancia de los cítricos en México (FAO, 2005), la amplia distribución del *Citrus cachexia viroid* (CcaVd) en nuestro país y muchas otras regiones

productoras de cítricos en el mundo (Uc *et al.*, 2005; Alvarado *et al.*, 1998; Moreno, 2000; Duran *et al.*, 2005), además de la detección de este viroide en otras especies de importancia económica (Wah y Symons, 1999) y la existencia de especies susceptibles y tolerantes al CcaVd en cítricos (Rocha y Padrón, 1992; Castle *et al.*, 1987; Reanwarakorn y Semancik, 1999), es importante analizar en cítricos el patrón de expresión de genes en plantas susceptibles y tolerantes durante la infección por CCaVd, ya que la comparación del patrón de expresión de genes incrementará nuestro entendimiento en la respuesta diferencial de dos hospedantes cuya respuesta al ataque de un mismo patógeno es totalmente diferente. Esta información podrá a su vez contribuir en el desarrollo y diseño de nuevas estrategias de manejo de las enfermedades causadas por estos patógenos.

4.3. REVISIÓN DE LITERATURA

Los viroides afectan una variedad de hospedantes y son diversos los trabajos que describen las alteraciones del hospedante, así como los efectos histopatológicos y moleculares provocadas por estos patógenos (Moreshet *et al.*, 1998; El-Shafy *et al.*, 1971). En este capítulo se describen las alteraciones que por su efecto y origen servirán de marco teórico para los objetivos aquí planteados. Así se describen las alteraciones en la concentración de proteínas y de ARNm que inducen los viroides en las plantas infectadas.

4.3.1. Alteraciones en el nivel de proteínas y otros compuestos

El viroide *Citrus exocortis viroid* (CEVd), indujo un incremento en la acumulación de ácido géntísico por cerca de 150 veces en plantas de tomate con relación a plantas no infectadas, lo cual se debió a que los ácidos benzoico y ácido salicílico fueron rápidamente convertidos a ácido géntísico (Belles *et al.*, 1999). El ácido géntísico exógeno provocó la acumulación de las proteínas PR (P23, P32 Y P34) antifúngicas inducidas por CEVd, pero estas proteínas no fueron inducidas por

ácido salicílico exógeno, el cual es capaz de inducir otras proteínas PR inducidas por CEVd en tomate (Belles *et al.*, 1999).

Otros autores identificaron proteínas tipo osmotina (proteína PR ubicada dentro del grupo PR-5) inducidas de manera específica por el *Tomato planta macho viroid* en plantas de tabaco y tomate (Medrano *et al.*, 1992). Por otra parte, el CEVd ocasiona un decremento del nivel de putrescina libre en tomate var. Rutgers y *Gynura aurantiaca* (Belles *et al.*, 1991). Estos cambios en el nivel de putrescina son regulados vía actividad de la ornitina descarboxilasa (Belles *et al.*, 1993).

Conejero y colaboradores (1979), reportaron que CEVd indujo en plantas de tomate y papa el incremento en la acumulación de dos proteínas de bajo peso molecular las cuales fueron de 12000 daltons (P1) y 16300 daltons (P2) mientras que en *Gynura* y cidra los tamaños fueron de 13700 (P1) y 18000 daltons (P2). Sin embargo, estas proteínas también se indujeron de manera natural en plantas senescentes de *Gynura*.

Vera y colaboradores (1988, 1989), determinaron que una proteinasa relacionada con la patogenicidad (P69), se acumula intra y extracelularmente en células del parénquima foliar de plantas de tabaco infectadas por el CEVd. Intracelularmente esta proteína siempre se le encontró dentro de la vacuola, mientras que extracelularmente se encontró asociado con un material denso electrónicamente y disperso en los espacios intercelulares.

Rodrigo y colaboradores (1989), reportaron la degradación de proteínas relacionadas con la patogénesis por actividad endoproteolítica (una aspartil-endoproteinasa de 37000 Da) constitutiva que co-localiza con proteínas PR en el espacio intercelular de hojas de tomate infectadas por CEVd. Los mismos autores mencionan que esta proteasa presenta una inhibición selectiva por pepstatina. Por otra parte en extractos crudos, la enzima no parece degradar a otras proteínas y su especificidad sugiere que esta involucrada en la vía de degradación extracelular de proteínas PR y en la regulación de su función biológica.

El PSTVd provocó una alteración en el estado de fosforilación de una proteína del hospedante (P68) en plántulas de tomate, sugiriendo que esta proteína tiene actividad cinasa dependiente de ARN de doble cadena (Hiddinga *et al.*, 1988).

4.3.2 Silenciamiento y alteraciones en la expresión de genes

Los viroides son capaces de inducir silenciamiento de ARN mediante ARNs de interferencia. Sin embargo, la cantidad de ARNs pequeños de interferencia no está directamente relacionada con el grado de virulencia de los aislados del viroide, incluso se ha observado en algunos casos, una correlación inversa entre la concentración del ARN del viroide y la concentración de los ARNs de interferencia en las plantas infectadas con los viroides *Avocado sunblotch*, *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* y *Peach latent viroid* (Papaefthimiou *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2002). Lo anterior es consistente con la participación de los ARNs de interferencia en el silenciamiento post- transcripcional de genes (Hamilton and Baulcombe, 1999), como una respuesta de defensa del hospedante, lo cual podría influir en el efecto detrimental de los viroides al disminuir su título en los tejidos (Martínez *et al.*, 2002). La primera evidencia firme que sugiere que la expresión sintomatológica de las plantas infectadas con viroides es causada por el silenciamiento de genes de importancia fisiológica para la planta hospedante fue descrita por Wang y colaboradores en el 2004.

Denti (2004), menciona que los ARNs de interferencia se acumulan en el citoplasma y no en el núcleo de las células de plantas de tomate infectadas con el PSTVd (familia *Pospiviroidae*), en tanto que el ARN del viroide se acumula solo en el núcleo. Por otro lado, los viroides de la familia *Avsunviroid*: *Peach latent mosaic viroid*, *Avocado sunblotch viroid* y *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid*, se replican y acumulan en el cloroplasto (Tabler y Tsagris, 2004.) y también ocasionan que se incremente la concentración en menor o mayor grado de ARNs de interferencia específicos. Para el caso del *Avocado sunblotch viroid*, los ARNs de interferencia no son específicos para el viroide (Martínez *et al.*, 2002). La concentración del viroide

ASBVd en plantas de aguacate, así como los síntomas de la enfermedad, son factores que influyen en la detección y título de los ARNs de interferencia que participan en el silenciamiento post-transcripcional, ya que en tejidos dañados de (moteados, blanqueados) aguacate se detectaron ARNs de interferencia, pero no en tejidos aparentemente sanos de la misma hoja (Markarían *et al.*, 2004).

Las alteraciones que provocan los viroides a nivel molecular han permitido identificar un gen de la proteína cinasa pkv (55 kDa), que se activa transcripcionalmente en plantas infectadas con variantes severas o intermedias de PSTVd y a bajo nivel en plantas infectadas por variantes ligeras (Hammond y Zhao, 2000). Por otro lado, se ha reportado que el CEVd afecta el nivel de transcritos del gen que codifica para la giberelina oxidasa 20 (una de las enzimas involucrada en la ruta de biosíntesis de giberelina GA53, a formas activas Ga1) en cítricos. Además se observó una correlación en el nivel de transcritos del gen giberelina oxidasa 20 y Ga1. Este mismo efecto es ocasionado por bajas temperaturas (17 a 12 °C). Los autores sugieren que la reducción en el tamaño del árbol afectado por patógenos como CEVd puede deberse parcialmente a la regulación de los niveles de transcritos del gen de la giberelina oxidasa 20 (Vidal *et al.*, 2003). Las alteraciones mencionadas anteriormente a nivel de proteínas y genes del hospedante, debidas a viroides de los cítricos, se han realizado en modelos herbáceos y no en cítricos, por lo que resulta importante determinar el comportamiento de la última especie a la infección por viroides. El objetivo de este trabajo fue identificar a los genes expresados diferencialmente en plantas susceptibles, lima rangpur (*Citrus limonia*), y tolerantes, naranjo agrio (*Citrus aurantium*), durante la infección por *Citrus caquexia viroid*.

4.4. MATERIALES Y METODOS

4.4.1. Preparación del material vegetal para la expresión diferencial

Con el objeto de contar con material sano tolerante a CcaVd, se utilizó semilla de naranjo agrio (*Citrus aurantium*) certificada como libre de patógenos y semilla de lima rangpur (*Citrus limonia*) como especie susceptible a CcaVd, ambos provenientes de la huerta productora de semillas de cítricos en Pancho Villa, Guemes Tamaulipas. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% por 10 min, seguido de un paso en etanol al 75% durante 10 min, posteriormente, tres lavados con agua destilada estéril después de cada tratamiento con el desinfectante (Hassanein y Azooz, 2003). La semilla desinfectada fue sembrada en medio MS (Murashige y Skoog) suplementado con 3% de sacarosa. Dos meses después de la germinación de la semilla, se eligieron tres plántulas de cada especie y se inocularon con 100 ng de ADNc de CcaVd, siguiendo la técnica de Roistacher (1991). Posteriormente se colectaron muestras a los 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30 y 45 días después de la inoculación. Como testigos, se utilizaron tres plantas de cada especie, inoculadas con amortiguador de fosfatos y tres plantas sin inocular. Todas las plantas utilizadas en esta etapa del trabajo fueron mantenidas en el cuarto de cultivo de tejidos con fotoperiodo de 12 hrs de luz y 12 de oscuridad a una temperatura de 25° C.

4.4.2. Identificación de genes

Para identificar a los genes que se expresen diferencialmente en los cítricos en respuesta a CcaVd, se realizó el ensayo de despliegue diferencial como a continuación se describe:

Se extrajo ARN total a partir de brotes tiernos de plantas de naranjo agrio y lima rangpur sanas e infectadas con CcaVd, siguiendo la técnica descrita por Chomzinsky y Sacchy (1987). A las muestras de ARN total se les realizó un

tratamiento con DNAsa I (Turbo DNAsa libre de RNAsa), siguiendo las instrucciones del proveedor (Ambion®). La integridad del ARN extraído en plantas sanas y enfermas (inoculado con CcaVd), fue determinada mediante electroforesis en agarosa y se cuantificó por espectrofotometría. Un volumen de 2 µl de ARN (20 µg/µl) total fue utilizado para la síntesis del cDNA de cada una de las muestras, utilizando el oligo dT como iniciador (42 °C durante 1h). Cinco µl de cDNA de cada una de las muestras en cada uno de los tiempos y tratamientos fueron mezclados, formando un total de 9 muestras compuestas (tres inoculados con viroide, tres con buffer de fosfatos y tres testigos absolutos), las cuales fueron utilizados en la amplificación del ADNc mediante PCR, utilizando dATPs y 15 combinaciones de oligonucleotidos arbitrarios ("oligos" P) y "oligonucleotidos dT (poli T mas dos bases al final de la secuencia) en cada especie. El programa térmico utilizado fue de tres ciclos iniciales para permitir que los iniciadores se alinien e inicien la síntesis del ADN. Las condiciones de amplificación fueron las recomendadas por el fabricante del Kit (PROMEGA) de expresión diferencial (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Condiciones de amplificación utilizados en la prueba de expresión diferencial.

Temperatura (°C)	TIEMPO (Min)	No. CICLOS
94	5	1
50	30	1
94	2	1
94	1	40
54	1.30	40
72	2	40
72	10	Extensión
4	α	

Los fragmentos amplificados fueron fraccionados en un gel desnaturalizante (poliacrilamida 5%, urea 8 M) en amortiguador TBE 0.5 X, para lo cual se realizó una precorrida a 33 mA durante una hora. La muestra fue preparada mezclando 5 μ l del producto de PCR con 5 μ l del amortiguador de corrida (TBE). Posteriormente se desnaturalizó incubando durante 2 minutos a 94°C y luego se colocó inmediatamente en hielo. Los pozos del gel fueron lavados durante 10-15 min con buffer de corrida, después se cargó por duplicado 10 μ l de cada muestra y se dejó correr a 1 700 V hasta que el Xilencianol migró completamente.

Los productos se visualizaron mediante una tinción con plata siguiendo el protocolo de PROMEGA como sigue: el gel de poliacrilamida fue incubado en una solución fijadora (ácido acético al 10%) y bajo agitación por 20 min, después se realizaron tres lavados con agua destilada durante dos minutos cada uno. Posteriormente se tiñó el gel mediante incubación y agitación por 30 min en una solución de nitrato de plata más formaldehído al 37%, se lavó con agua destilada esteril durante 10 seg. el exceso de nitrato de plata en el gel y luego se transfirió en una solución de desarrollo (3 ml de formaldehído 37%, 400 μ l de tiosulfato de sodio y 60 g de carbonato de sodio en un volumen final de 2 L) hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo con una solución de ácido acético (10%) durante 2-3 minutos y tres lavados con agua destilada estéril dos minutos cada uno.

Las bandas correspondientes a los transcritos cuya concentración fue modificada por el viroide, esto es, la presencia de una banda, la ausencia de una banda o una mayor o menor intensidad de banda en los tratamientos con relación al testigo, fueron considerados como debidos a la infección por el viroide.

Una verificación preliminar de las bandas de interés se realizó mediante una reamplificación de las muestras, utilizando el mismo par de oligos utilizado en su amplificación. Las bandas que reamplificaron fueron cortados y purificados mediante el kit de purificación QUIAEX II (Invitrogen), posteriormente fueron ligadas en el vector de clonación PGEM T-Easy siguiendo el protocolo descrito anteriormente para la identificación de las variantes de viroides de los cítricos (capítulo 2).

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Preparación de material vegetal para Expresión diferencial

El despliegue diferencial realizado en las planta inoculadas con *Citrus cachexia viroid* y los controles en lima rangpur como especies susceptible, permitió identificar un total de 529 bandas, de las cuales siete incrementaron su expresión, cuatro disminuyeron, 16 se apagaron y 18 se encendieron en lima rangpur. Todas estas bandas fueron reamplificadas (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Numero de bandas amplificadas con expresión diferencial en cada uno de los tratamientos en Lima rangpur.

Oligos	Expresión (+)	Expresión (-)	Apagadas	Encendidas	Total
P5-T3	2	---	---	2	38
P3-T5	---	---	1	3	46
P9-T1	---	---	---	---	9
P1-T9	4	---	---	---	56
P2-T2	---	1	1	---	26
P4-T7	---	---	---	---	17
P6-T4	---	---	1	1	23
P7-T6	---	---	2	1	28
P8-T3	---	---	1	1	25
P5-T9	1	---	1	---	37
P10-T8	---	---	1	3	49
P3-T2	---	2	---	4	34
P9-T5	---	---	4	1	21
P1-T3	---	1	3	2	62
P3-T8	---	---	1	---	58
Total	7	4	16	18	

Por otro lado, el despliegue diferencial realizado en las plantas inoculadas con *Citrus cachexia viroid* y los controles en naranjo agrio como especie tolerante permitió identificar un total de 435 bandas correspondientes a ARNs mensajeros (Cuadro 4.3), de las cuales cinco disminuyeron su expresión, 20 bandas se apagaron y 8 se encendieron.

Cuadro 4.3. Número de bandas amplificadas con expresión diferencial en cada uno de los tratamientos en Naranja agrio.

Oligos	Expresión (+)	Expresión (-)	Apagadas	Encendidas	Total
P5-T3	---	2	---	---	32
P3-T5	---	1	2	1	36
P9-T1	---	1	1	---	21
P1-T9	---	---	---	1	16
P2-T2	---	---	---	---	24
P4-T7	---	---	2	2	16
P6-T4	---	---	2	---	12
P7-T6	---	---	2	---	16
P8-T3	---	---	1	1	38
P5-T9	---	---	3	---	35
P10-T8	---	1	---	1	47
P3-T2	---	---	3	---	45
P9-T5	---	---	4	---	25
P1-T3	---	---	---	---	25
P3-T8	---	---	---	2	47
Total	0	5	20	8	

No se observaron bandas correspondientes a ARNs mensajero de naranja agrio con mayor expresión con relación al testigo en ninguna de las 15 combinaciones de oligonucleótidos utilizado en este trabajo (Cuadro 4.3).

Se reamplificaron las muestras y clonaron la totalidad de las bandas de interés, haciendo un total de 78 bandas. Actualmente se cuenta con 275 bandas que no han podido ser secuenciadas en MacroGen Corea. Sin embargo, este capítulo será continuado hasta obtener las secuencias y confirmar que la expresión diferencial de los genes de interés son debidos a la infección por el viroide *Citrus cachexia viroid*. También se han clonado y secuenciado los transcritos del gen de

actina de naranjo agrio y lima rangpur, los cuales serán utilizados como control de cargado en las pruebas de Northern blot, prueba que será utilizada para confirmar la expresión diferencial de los genes identificados.

4.6. LITERATURA CITADA

- Alvarado, G. O. G. 1998. Viroide de los cítricos: Implementación de técnicas moleculares de detección y determinación de infección natural en el campo. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. 86 p.
- Belles, J. M., Carbonell, J. and Conejero, V. 1991. Polyamines and plants infected by Citrus exocortis viroid or treated with silver ions and ethephon. Plant Physiology 96: 1053- 1059.
- Belles, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., and Conejero V. 1999. Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. Molecular Plant Microbe Interactions 12: 227-235.
- Belles, J.M., Perez, M. A., Carbonell, J. And Conejero V.1993. Correlation between ornithine descarboxylase and putrescine in tomato plants infected by Citrus exocortis viroid or treated with ethefon. Plant Physiology 102:933-937.
- Castle, W. S. 1987. Citrus rootstock. In: Rootstock for fruit crops. John Wiley & Sons. United States of America. pp. 361-399.
- Chonzinnsky, P y Sacchi, N. 1987. A rapid and sensitive method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol-chloroform extraction. Annals of biochemistry 162: 156-159.
- Conejero, V., Picazo, I. Segado, P. 1979. Citrus exocortis viroid (CEV): proteins alterations in different hosts following viroid infection. Virology 97: 454-456.

- Denti, M. A., Boutla, A., Tsagris, M, and Tabler, M. 2004. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *The Plant Journal* 37: 762-769.
- Diener, T. O. 1987. *The Viroids*. Plenum Press, New York. USA. 344 p.
- El-Shafy, A., Calavan, E. C. and Desgardins, P. R. 1971. Comparative anatomy of healthy and exocortis virus infected citron plants. *Phytopathology* 61: 990-993.
- Fagoaga, G., and Durán, V. N. 1996. Naturally occurring variants of citrus exocortis viroid in vegetables crops. *Plant Pathology* 45: 45-53.
- FAO, 2005. Estadísticas Agrícolas de la Organización Mundial para la agricultura y la alimentación (FAO, por sus siglas en ingles). <http://www.fao.org>.
- Flores, R., Hernández, C., Martínez, A. E., Darós, J. A. and Di Serio, F. 2005. Viroids and viroid- host interaction. *Annual Review of Phytopathology* 43: 117-139.
- Hassanein, A. M, Azooz, M. M. 2003. Propagation of *Citrus reticulata* vía *in vitro* seed germination and shoot cuttings. *Biología plantarum* 47: 173-177.
- Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plant. *Science* 286: 950-952.
- Hammond, R. W. and Zhao, Y. 2000. Characterization of a tomato protein kinasa gene induced by infection by potato spindle tuber viroid. *Molecular Plant Microbe Interactions* 13: 903-910.
- Hiddinga, H, J., Crum, C. J. and Roth, D.A. 1988. Viroid induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA dependent protein kinase. *Science* 241: 451-453.
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R. A., Nelson, R. S. and Ding, B. 2002. Potato spindle tuber viroide strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15: 990-999.
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W. and Semancik, J. S. 2004. RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology* 149:397-406.

- Martinez de Alba, A. E., Flores, R, and Hernandez, C. 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology* 76: 13094-13096.
- Medrano, R. R., Moraila, J. B., Estrella, H. L. and Bustamante R, R. 1992. Nucleotide sequence of an osmotin-like cDNA induced in tomato during viroid infection. *Plant Molecular biology* 20: 1199 - 1202.
- Moreschet, S., Cohen, S., Azor, Z. and Bar, J. M. 1998. Water relations of citrus exocortis viroid infected grapefruit trees in the field. *Journal of Experimental Botany* 49: 1421-1430.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M. a., Baulcombe, D. C., Tsagris, M, and Tabler, M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research* 29: 2395-2400.
- Rocha-Peña, M. A., y Padrón-Chávez, J. E. 1992. Precauciones y usos de portainjertos de cítricos tolerantes al virus de la tristeza. Publicación especial No.2. Campo Experimental General Terán. INIFAP. México 48 p.
- Rodrigo, I., Vera, P. and Conejero V. 1989. Degradation of tomato pathogenesis related proteins by an endogenous 37 kDa aspartyl endoproteinase. *European Journal of Biochemistry* 184: 663-669.
- Roistacher, C. N. 1991. Graft transmissible diseases of citrus handbook for detection and diagnosis. FAO. Roma, Italy. 286 p.
- Tabler, M., and Tsagris, M. 2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS in Plant Science* 9: 339-348.
- Uc, V. A., Rodríguez, G. C. M. and Moreno, V. O. A. 2005. Presencia de viroides de los cítricos e incidencia de CcaVd y CEVd en Yucatán México. Memorias del XXXII congreso nacional de Fitopatología y VII congreso internacional de Fitopatología. Chihuahua, Chi. México. P.78
- Vera, P. and Conejero, V. 1988. Pathogenesis related proteins of tomato P69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* 87: 58-63.

- Vera, P., Hernández, Y. J. and Conejero V. 1989. Inmunogold localization of the citrus exocortis viroid induced pathogenesis related proteinase P69 in Tomato leaves. *Plant Physiology* 91: 119-123.
- Vidal, A. M., Cheikh, W. B., Talon, M. and Martinez, G. J. L. 2003. Regulation of giberellin 20 oxidase gen expression and giberellin content in citrus by temperature and citrus exocortis viroid. *Planta* 217: 442-448.
- Wang, M. B., Bian, X. Y., Wu, L. M., Liu. L. X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R. M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S, and Waterhouse, P. 2004. On the role RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 3275-3280.
- Wah, Y. F. and Symons, R. H. 1999. Trnsmission of viroids grape seeds. *Journal of Phytopathology* 147: 285-291.

4.7. DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados en las pruebas de RT-PCR realizadas en este trabajo para determinar la incidencia y distribución del *Citrus exocortis viroid* y *Citrus cachexia viroid*, indicaron que estos dos viroides se encuentran ampliamente distribuidos en el estado con incidencias del 40 al 70% (Fig. 2.2). Estos resultados coinciden con los reportados en otros estados del país (Alvarado *et al.*, 2000; Almeyda *et al.*, 2002). Sin embargo, también sugieren que los viroides de los cítricos, en especial CEVd y CcaVd son un problema real y no potencial para la citricultura mexicana como anteriormente se ha reportado (Rocha *et al.*, 1992) y los efectos son observados, incluso sobre patrones reportados como tolerantes (Fig. 2.3).

Por otro lado, se observó de manera general que los dos viroides, CEVd y CcaVd, se encontraron en mayor incidencia en el Sur del estado con relación al Centro y al Oriente (Fig. 2.2). Con estos resultados, se recomienda el cumplimiento riguroso de las disposiciones establecidas en la NOM 031 (SAGARPA 2001), para evitar que las nuevas plantaciones cítricas que se establecen sobre portainjertos tolerantes al CTV (3000 has/año), pero susceptibles a viroides (Jasso, 2005), se realicen en áreas con alta incidencia de viroides de los cítricos y de esta manera evitar que estos patógenos provoquen un efecto desastroso en la citricultura mexicana,

La presencia en las plantaciones cítricas de Yucatán de casi todas las especies de viroides de los cítricos reportados a la fecha (Fig 2.1). Obliga a plantear en el futuro estudios dirigidos a entender mejor el impacto de estos patógenos en sus hospedantes bajo las condiciones en la región, así como determinar el comportamiento epidemiológico de los viroides y sus interacciones con sus hospedantes silvestres.

La interacción tipo sinergismo que puede existir entre las diferentes combinaciones de viroides de los cítricos, misma que se ha reportado, ocurre en especial en la lima persa (Tabla 2.2), sugiere que los viroides pueden ser patógenos más importantes por sus efectos que el VTC en México (Ochoa *et al.*, 1994), cuya incidencia

reportada en los huertos es de 4.34% y 0.70%; (Silva-Vara *et al.*, 2001) y no hay un solo reporte de árboles muertos por VTC en el país hasta el momento.

Las evidencias tales como la estructura secundaria, el porcentaje de identidad con el genoma completo y con los dominios conservados, además del análisis filogenético del CEVd-Yuc (Fig. 1, 2 y 3 del Capítulo 3), al ser comparados con secuencias de CEVd reportadas en la base de datos, confirman la presencia de un nuevo viroide de los cítricos, *Citrus exocortis viroid low sequence similarity* (CEVd-LSS), en Yucatán México, el cual tiene un tamaño de 390-395 pb y no induce síntomas visibles en naranjo agrio, lima rangpur, tomate y chile. Sin embargo, falta confirmar mediante los postulados de Koch la patogenicidad del nuevo viroide, mediante el uso de mayor número hospedantes herbáceos y perennes altamente susceptibles a viroides de los cítricos, tales como Cidra etrog, Mandarina pearson, Pepino variedad Poisett y *Gynura aurantiaca*, entre otros.

4.8. CONCLUSIONES GENERALES

Los viroides *Citrus exocortis viroid* y *Citrus cachexia viroid* se encuentran ampliamente distribuidos en el estado de Yucatán (con incidencias del 40 al 70 %), independientemente de la edad y la especie de cítrico. Estos dos viroides parecen encontrarse con mayor incidencia en el Sur en comparación con la región Centro y Oriente del estado de Yucatán.

En las plantaciones citricolas de Yucatán se detectó mediante RT-PCR la presencia de CEVd, CcaVd, CEVd III y CVd-I los cuales fueron confirmados por secuenciación del genoma completo. Por lo que en México, este es el primer reporte de la presencia de CVd-I. Por otra parte, se identificó la presencia de CVd-IV, CVd-OS, CVd-I LSS mediante RT-PCR, sin embargo la secuenciación del genoma completo de estos viroides no fue posible.

Los viroides de los cítricos detectados en las plantaciones de Yucatán se presentaron en su mayoría, en forma de mezclas de 2 hasta 4 viroides en el mismo árbol, especialmente en lima persa.

Se identificó la presencia de una nueva especie de viroide de los cítricos en Yucatán y por sus características moleculares, origen filogenético y semejanzas con CEVd, fue nombrado tentativamente como, *Citrus exocortis viroid* low sequence similarity.

En plantas de lima ragpur y naranjo agrio inoculados con CcaVd se observó mediante despliegue diferencial, la aparición y desaparición de bandas (lo que sugiere el encendido y apagado de genes) en mayor proporción en relación a mayor o menor expresión de genes en plantas infectadas, comparadas con plantas control. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que aun falta demostrar y confirmar la expresión diferencial de estas bandas de interés.

4.9. PERSPECTIVAS

Continuar con la caracterización molecular de los viroides detectados en el estado de Yucatán, con el objeto de secuenciar el genoma completo de los viroides faltantes (CVd-IV, CVd-OS y CVd-LSS). Además, es conveniente determinar bajo las condiciones del país las alteraciones de cada uno de los viroides detectados sobre los hospedantes en los cuales fueron detectados, poniendo especial atención en la variante de CcaVd aislada de arboles de lima persa con sintomatología severa.

La presencia de los viroides de los cítricos en las plantaciones citricolas de Yucatán, en los cuales se intercalan cultivos de hortalizas importantes como el chile habanero y tomate, también hospedantes de estos viroides, sugieren que los efectos de estos patógenos no se limitan al cultivo de cítricos, por lo que la valoración del efecto de los CVds en hortalizas deben ser considerados de vital importancia.

Realizar la caracterización sintomatológica del CEVd-LSS (incluso en combinación con CVds) sobre mayor número de hospedantes herbáceos tales como papa, melón y especies de cítricos altamente susceptibles como cidra etrog y mandarina pearson. Considerando además, el uso de RNA del viroide obtenido mediante transcripción *in vitro*, así como el mantenimiento de las plantas infectadas a temperaturas más altas y durante mayor tiempo para permitir la acumulación de las partículas viroidales en el tejido vegetal.

Secuenciar las bandas de expresión diferencial identificadas en plantas de naranjo agrio y lima rangpur, y confirmar que la expresión diferencial es debida por Ccavd.