



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:

***Identificación y caracterización biológica y molecular de
viroides en la región citrícola del Río Uruguay***

Tesista: Giovanna Joris

Director/a: Dra. Carina Andrea Reyes Martínez

Codirector/a: Dra. Gabriela Conti

Año: 2024

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CCT-La Plata-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Carina Andrea Reyes Martínez y codirección de la Dra. Gabriela Conti.

*A mis padres, todo lo que soy es gracias a ellos.
Y gracias a mí, por reinventarme cada vez que fue necesario.*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	8
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	10
I.1. La citricultura en el mundo y en Argentina	10
I.2. Enfermedades de cítricos	12
I.3. Viroides	12
I.4. Clasificación de viroides	12
I.5. Replicación y movimiento de los viroides en plantas	16
I.6. Movimiento de los viroides dentro y fuera de la célula	18
I.7. Sintomatología y rango de hospedantes de los viroides	18
I.8. Transmisión	19
I.9. Viroides de los cítricos	20
I.9.1. <i>Citrus Exocortis viroid</i> : CEVd	20
I.9.2. <i>Hop stunt viroid</i> : HSVd	21
I.9.3. <i>Citrus dwarfing viroid</i> : CDVd	23
I.9.4. <i>Citrus bent leaf viroid</i> : CBLVd	24
I.9.5. <i>Citrus bark cracking viroid</i> : CBCVd	25
I.9.6. <i>Citrus viroid V</i> : CVd-V	25
I.9.7. <i>Citrus viroid VI</i> : CVd-VI	26
I.9.8. <i>Apscaviroid cvd-VII</i> : CVd-VII	26
I.10. Métodos de diagnóstico de viroides	27
I.10.1. Métodos biológicos:	27
I.10.2. Métodos moleculares:	28
HIPÓTESIS DE TRABAJO	32
OBJETIVOS GENERALES	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
II. MATERIALES Y MÉTODOS	33
II.1. MATERIALES	33
II.1.1. Reactivos químicos	33
II.1.2. Plantas de Cidra Etrog	33
II.1.3. Plantas de tomate	33
II.1.4. Plantas de pepino	33
II.1.5. Testigos de viroides	34
II.1.6. Muestras de viroides	34
II.1.7. Cebadores	35

II.2. MÉTODOS.....	36
II.2.1. Toma de muestras y desinfección de varetas.....	36
II.2.2. Inoculación de muestras mediante injerto en cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.).....	36
II.2.3. <i>Indexing</i> biológico, observación de síntomas en cidra Etrog.....	36
II.2.4. Extracción de ARN para Electroforesis Secuencial (sPAGE).....	36
II.2.5. Análisis del ARN mediante sPAGE.....	37
II.2.6. Extracción de ARN para RT-qPCR.....	37
II.2.7. Digestión con ADNsa libre de ARNsa.....	37
II.2.8. Análisis del ARN mediante RT-qPCR.....	38
II.2.9. Aislamiento de viroides desde gel de poliacrilamida.....	39
II.2.10. Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de severidad.....	39
II.2.10.1. Inoculación de plantines de cidra Etrog.....	39
II.2.10.2. Inoculación de plantines de tomate.....	39
II.2.10.3. Inoculación de plantines de pepino.....	40
II.2.11. Secuenciación convencional.....	40
II.2.11.1. Reacción de transcripción reversa (RT).....	40
II.2.11.2. Reacción de amplificación del ADN copia.....	40
II.2.11.3. Purificación de ADN a partir del producto de PCR.....	41
II.2.11.4. Clonado en pGEM®-T <i>Easy Vector</i>	41
II.2.11.5. Colony PCR.....	41
II.2.11.6. Minipreparación de ADN plasmídico.....	41
II.2.11.7. Verificación de calidad de las minipreps.....	42
II.2.12. Análisis de las secuencias.....	42
II.2.12.1. Procesamiento de las secuencias.....	42
II.2.12.2. Predicción de estructura secundaria de los viroides.....	42
II.2.12.3. Construcción de árboles filogenéticos.....	42
Capítulo 1.....	43
Identificación de viroides presentes en la región citrícola del Río Uruguay ...	43
INTRODUCCIÓN.....	44
1.A. Selección de áreas representativas de la región citrícola del Río Uruguay y recolección de muestras de plantas cuya sintomatología sugiera la presencia de viroides.....	45
1.B. Identificación de viroides.....	48
<i>Indexing</i> biológico.....	48
Electroforesis Secuencial (sPAGE).....	51
RT-qPCR.....	53

1.C. Aislamiento de los diferentes viroides encontrados para caracterizarlos biológica y molecularmente.	58
DISCUSIÓN	61
Capítulo 2.....	63
<i>Citrus Exocortis viroid</i>.....	63
INTRODUCCIÓN.....	64
2.A. Cuantificación de CEVd mediante RT-qPCR.....	65
2.B. Caracterización molecular de aislamientos de CEVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.....	68
2.C. Caracterización biológica de aislamientos de CEVd, mediante observación de sintomatología y análisis de la acumulación en plantas de tomate.....	78
DISCUSIÓN	81
Capítulo 3.....	83
<i>Hop stunt viroid</i>	83
INTRODUCCIÓN.....	84
3.A. Cuantificación de HSVd mediante RT-qPCR.....	86
3.B. Caracterización molecular de aislamientos obtenidos de HSVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.	88
3.C. Caracterización biológica de aislamientos de HSVd, mediante observación de sintomatología y acumulación en plantas de pepino.	94
DISCUSIÓN	98
Capítulo 4.....	100
<i>Citrus dwarfing viroid</i>	100
INTRODUCCIÓN	101
4.A. Cuantificación de CDVd mediante RT-qPCR	102
4.B. Caracterización molecular de aislamientos obtenidos de CDVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.	104
4.C. Caracterización biológica de aislamientos de CDVd, mediante observación de sintomatología y acumulación en plantas de cidra Etrog.....	109
DISCUSIÓN.....	113
Capítulo 5.....	115
Ajuste e implementación de metodología RT-qPCR para la detección de viroides de cítricos.....	115
INTRODUCCIÓN.....	116
RESULTADOS.....	117
5.A. Selección de cebadores para los viroides CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd, y para los genes vegetales seleccionados como controles internos.	117
5.B. Cálculo de eficiencia para los pares de cebadores elegidos	118

5.B.1. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CEVd	118
5.B.2. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para HSVd	119
5.B.3. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CDVd	120
5.B.4. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CBLVd	121
5.B.5. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcripto de ubiquitina de cidra Etrog.....	122
5.B.6. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcripto de ubiquitina de tomate	123
5.B.7. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcripto de COX (citocromo oxidasa) de cidra Etrog.....	124
5.B.8. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcripto de COX de tomate	125
5.C. Implementación de protocolos de RT-qPCR que permitan detectar los viroides en estudio en muestras provenientes de distintas especies vegetales.....	127
DISCUSIÓN	128
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA.....	135
ANEXO I	142
ANEXO II	150
ANEXO III	154
ANEXO IV	191
ANEXO V	195

ABREVIATURAS

- ADN: ácido desoxirribonucleico
- ADNasa: enzima (nucleasa) llamada desoxirribonucleasa
- ARN: ácido ribonucleico
- ARNasa: enzima (nucleasa) llamada ribonucleasa
- C: dominio central
- CBCVd: *Citrus bark cracking viroid*
- CBLVd: *Citrus bent leaf viroid*
- CCR: región central conservada
- CDVd: *Citrus dwarfing viroid*
- CEVd: *Citrus Exocortis viroid*
- COX: citocromo oxidasa
- Ct: ciclo umbral de una PCR.
- CUIS: Centro Único de Introducción y Saneamiento
- CVd-V: *Citrus viroid V*
- CVd-VI: *Citrus viroid VI*
- CVd-VII: *Apscaviroid cvd-VII*
- d: detectable.
- EEA: Estación Experimental Agropecuaria
- EEUU: Estados Unidos
- Etc.: etcétera
- EX: extracción
- HHR: hammerhead ribozymes
- HSVd: *Hop stunt viroid*
- ICTV: Comité Internacional de Taxonomía de virus, o *International Committee on Taxonomy of Viruses* por sus siglas en inglés
- INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
- M: muestra
- nd: no detectable
- NEA: Noreste argentino
- NOA: Noroeste argentino
- NTC: control sin plantilla o *no template control* por sus siglas en inglés.
- P: dominio patogénico.
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa o *polymerase chain reaction* por sus siglas en inglés.
- P_R: motivo patogénico derecho ubicado en el dominio variable de la secuencia del viroide.
- P_L: motivo patogénico izquierdo ubicado en el dominio patogénico de la secuencia del viroide.
- RNAi: ARN de interferencia.
- RT-PCR: transcripción reversa o *reverse transcription* por sus siglas en inglés, seguida de una PCR.
- RT-qPCR: transcripción reversa seguida de una PCR en tiempo real.

- sPAGE: electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida o *secuencial polyacrilamide gel electrophoresis* por sus siglas en inglés.
- T (-): control negativo
- T (+): control positivo
- tasiRNA: pequeños ARN de interferencia de acción trans o *trans-acting small interfering RNAs* por sus siglas en inglés.
- TCH: horquilla conservada terminal
- TCR: región conservada terminal
- T_L: dominio terminal, extremo izquierdo
- T_R: dominio terminal, extremo derecho
- Xc: xilencianol
- V: dominio variable
- vdsRNA: ARN pequeños derivados de viroides
- Vs: versus

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. La citricultura en el mundo y en Argentina

Los cítricos se desarrollan en casi todas las regiones del mundo dentro de la banda delimitada por la línea de 40° de latitud Norte y Sur. Las numerosas especies del género *Citrus* provienen de las zonas tropicales y subtropicales de Asia, desde allí se distribuyeron a otras regiones del mundo donde hoy se cultivan (Anderson *et al.*, 1996).

Actualmente, China es el principal productor mundial con una producción de 37.5 millones de toneladas anuales. Argentina, por su parte, en el año 2021, ocupó el noveno lugar, manteniéndose siempre a lo largo de los años entre el octavo o noveno lugar (Federcitrus, 2022).

La citricultura en la Argentina es una de las actividades frutícolas más importantes (Figura 1). Las plantaciones se hallan localizadas en distintas áreas con diferentes condiciones agroecológicas sumando un total de aproximadamente 120000 hectáreas plantadas. Las principales provincias productoras de cítricos son Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Formosa, Misiones, Entre Ríos, Corrientes y Buenos Aires (SENASA 2022). Las áreas donde se cultivan se agrupan en dos grandes regiones: el NEA (Noreste argentino) y NOA (Noroeste argentino), repartiéndose la producción nacional en un 35.1% y un 64.9% para cada área respectivamente (Federcitrus, 2022).



Figura 1: Estimación de la producción nacional en toneladas de los principales grupos de frutas de Argentina en 2021 (Federcitrus, 2022).

En el NEA predomina la producción de naranjas y mandarinas (Figura 2), principalmente para consumo en fresco, con destino a mercado interno y exportación, y en menor medida con destino a industria. Las plantaciones se concentran en 5 regiones, siendo estas San Pedro en la provincia de Buenos Aires; la región citrícola del Río Uruguay conformada por los departamentos de Concordia y Federación en la provincia de Entre Ríos, y Monte Caseros en la provincia de Corrientes; la región de Bella Vista en Corrientes; y, por último, las provincias de Misiones y Formosa (SENASA, 2022; Federcitrus, 2022).

En el NOA a su vez, se producen principalmente naranjas, mandarinas, y limones (Figura 2). En Salta y Jujuy se concentra la producción de variedades tempranas de naranjas y mandarinas, y en menor medida de pomelo; mientras que en Tucumán se concentra la mayor parte de la producción de limón del país. En Catamarca la producción es menor, centrándose en naranjas y mandarinas. A lo largo de los años, la tendencia se ha mantenido, siendo el limón el cultivo principal en esta región, seguido de naranjas y mandarinas, y por último pomelo (SENASA, 2022; Federcitrus, 2022).

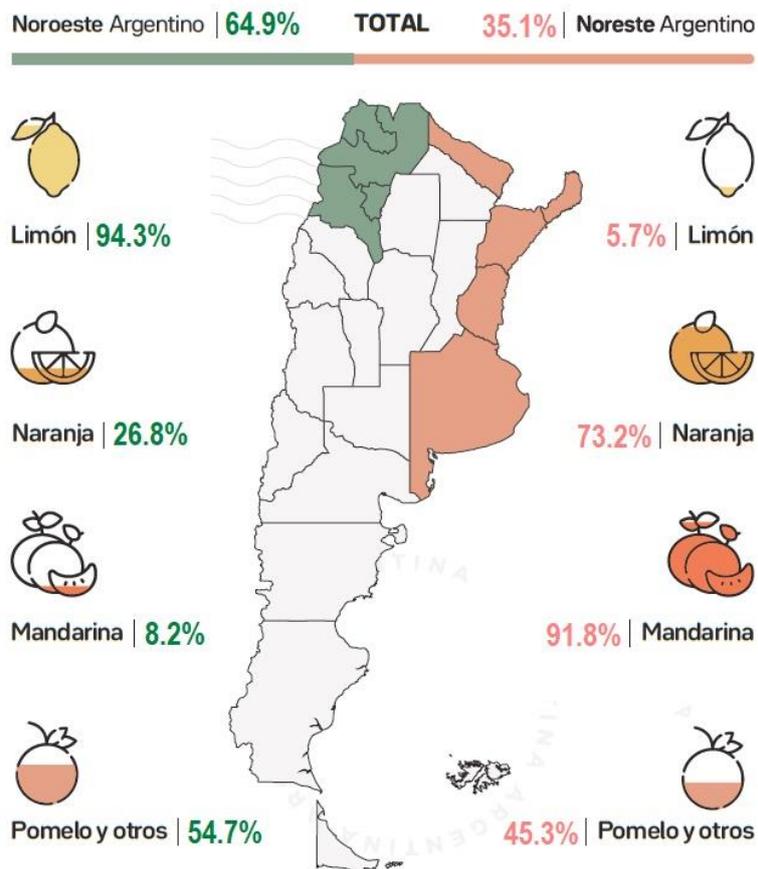


Figura 2: Distribución de la producción de cítricos en el país en porcentajes, por cultivo y región (Federcitrus, 2022).

En el año 2021, se estimó que nuestro país produjo 3.57 millones de toneladas de cítricos, correspondiendo un 56.6% a limones, 29.1% a naranjas, 11.8% a mandarinas y 2.5% a pomelos (Figura 3) (Federcitrus, 2022).

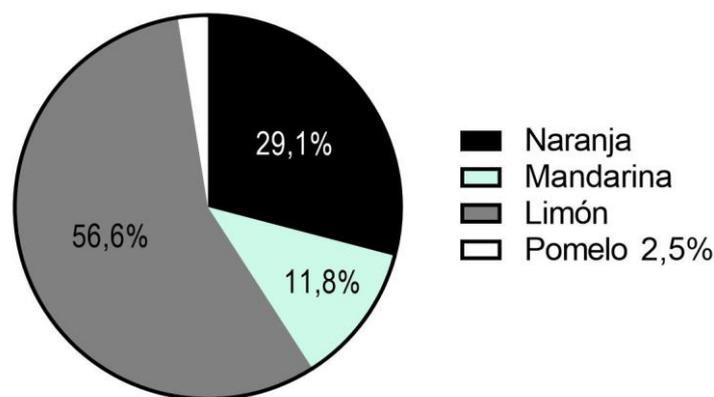


Figura 3: Distribución de los porcentajes de la producción total de cítricos en Argentina por cultivo.

I.2. Enfermedades de cítricos

Los cítricos, al igual que otros cultivos, son susceptibles a diversas enfermedades y plagas. Éstas son causadas por insectos, ácaros, hongos, bacterias, nematodos, virus, viroides, citoplasmas y otros organismos que pueden afectar la producción y la calidad de la fruta, al igual que la longevidad de los árboles. La mayoría de las plagas pueden controlarse en las plantaciones con prácticas culturales, control mecánico, aplicación de agroquímicos, control biológico, etc. No obstante, los patógenos sistémicos (virus, viroides, algunas bacterias y fitoplasmas) sólo pueden prevenirse previo a la plantación utilizando material cítrico proveniente de un programa de saneamiento y certificación (Roistacher, 1991), y una vez establecido el cultivo, siguiendo un enfoque de manejo integrado de plagas que implique monitoreo del lote, manejo de insectos vectores y eliminación de plantas enfermas.

I.3. Viroides

Los viroides son patógenos muy pequeños, con un tamaño 10 veces inferior que los virus más pequeños y constan de una sola molécula de ARN que oscila entre 246-430 nucleótidos. Su molécula es circular y su estructura está definida por el número y secuencia de nucleótidos que lo componen. El elevado grado de complementariedad interna les confiere una gran estabilidad, y al no codificar ninguna proteína, se los considera parásitos intracelulares. Es el único agente infeccioso restringido al reino vegetal, presentando una amplia gama de hospedantes, entre diferentes cultivos y plantas ornamentales, incluidos los cítricos. Dependen de las secuencias y motivos de sus ARNs para infectar las células vegetales, lograr replicarse y completar su ciclo infeccioso (Ortolá y Daros, 2023).

I.4. Clasificación de viroides

Los viroides se dividen en dos familias, *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae*, según las diferencias entre las zonas conservadas de sus secuencias nucleotídicas, los motivos estructurales, el sitio de replicación y el análisis filogenético (Di Serio *et al.*, 2017; Flores, 2020). Ambas familias se subdividen en diferentes géneros.

Los viroides de la familia *Pospiviroidae* adoptan *in vitro* una estructura secundaria tipo varilla de mínima energía (Figura 4) con 5 dominios estructurales (Figura 5). La región central conservada (CCR; *central conserved region*), incluido un dominio central (C), está formado por 2 tramos de nucleótidos conservados, donde las hebras superiores están flanqueadas por una repetición invertida. El dominio C está rodeado a su derecha por el dominio variable (V) y a su izquierda por el dominio patogénico (P). En los extremos se ubican los dominios terminales, extremo derecho (T_R) e izquierdo (T_L). Dependiendo de la naturaleza del CCR, y de la presencia o ausencia de una región conservada terminal (TCR; *terminal conserved region*) (región de T_L) y una horquilla conservada terminal (TCH; *terminal conserved hairpin*) (región T_R), los miembros de esta familia se dividen en cinco géneros (Tabla 1) (Navarro, 2021; Ortolá y Daros, 2023).

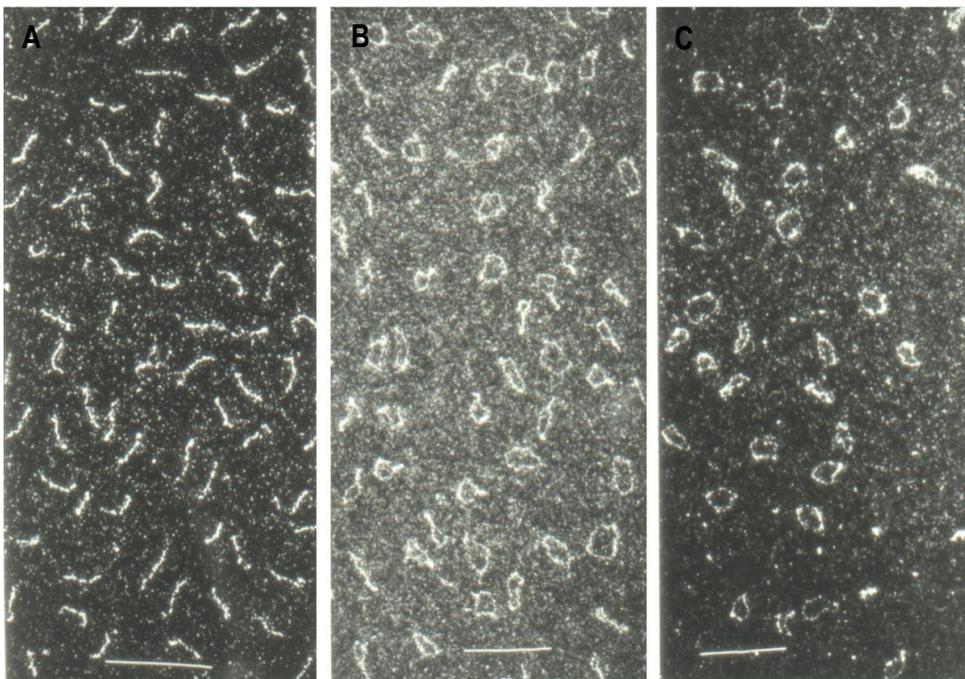


Figura 4: Microscopía electrónica del viroide PSTVd (*Potato spindle tuber viroid*) resuspendido en agua a temperatura ambiente mostrando su conformación de varilla (A); desnaturalizado a 40°C mostrando un estado intermedio donde se ven conformación circular y/o en varilla (B); y a 70°C donde está mayormente desnaturalizado por lo que principalmente se lo ve en su conformación circular de simple hembra (C) (Tomado de: Steger y Riesner, 2018).

La familia *Avsunviroidae* es mucho más pequeña, la conforman cinco viroides distribuidos en tres géneros (Tabla 1). Los viroides de esta familia no tienen una región central conservada, pero poseen otras regiones conservadas que les permiten autoclirse a través de las ribozimas cabeza de martillo (HHR; *hammerhead ribozymes*, en ambas polaridades del ARN). Las estructuras secundarias que adoptan son en forma de varilla, ramificadas o semiramificadas. Estos viroides se acumulan en cloroplastos y su mecanismo de replicación es mediante círculo rodante simétrico (Navarro, 2021; Ortolá y Daros, 2023).

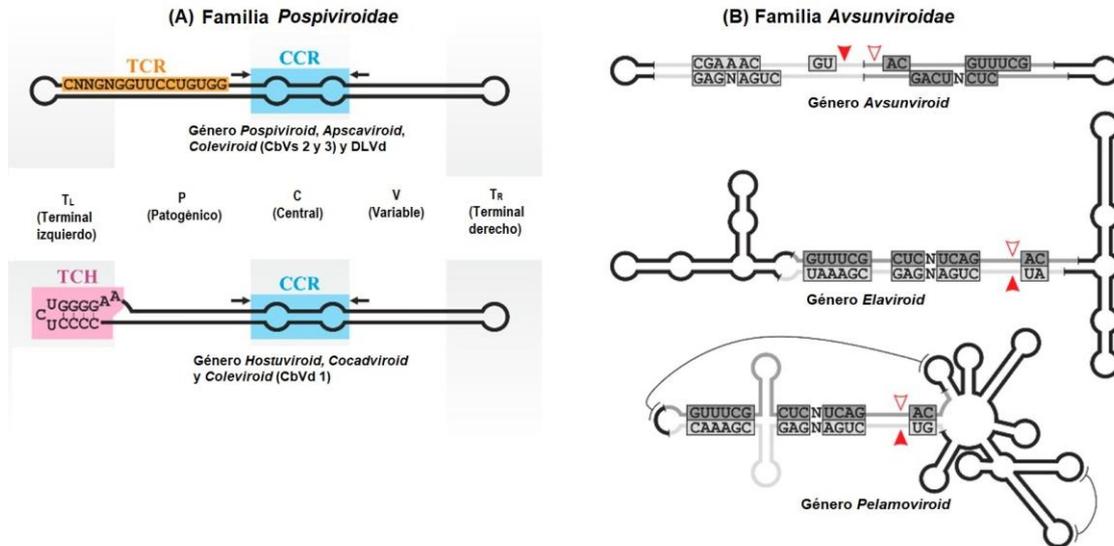


Figura 5: Modelo estructural para viroides. A) Estructura secundaria propuesta para la familia *Pospiviroidae* con sus 5 dominios (T_L , P, C, V y T_R) y las regiones conservadas (CCR, TCR y TCH). Junto al CCR en la hebra superior, se indican con flechas los nucleótidos variables flanqueantes que forman una horquilla imperfecta (horquilla I). B) Estructura secundaria propuesta para los tres géneros de la familia *Avsunviroidae*. Sus integrantes contienen secuencias conservadas de ribozimas de cabeza de martillo (HHR) en ambas hebras, que se resaltan en cajas de color gris claro u oscuro, mientras que con las puntas de flechas rojas se indican los sitio de autoescisión (Tomado de Ortolá y Daros, 2023).

<i>Familia</i>	<i>Género</i>	<i>Característica estructural</i>	<i>Nombre científico</i>	<i>Abreviatura</i>
<i>Pospiviroidae</i>	<i>Pospiviroid</i>	CCR + TCR	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	PSTVd
			<i>Citrus Exocortis viroid</i>	CEVd
			<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	CSVd
			<i>Columnnea latent viroid</i>	CLVd
			<i>Iresine viroid 1</i>	IrVd-1
			<i>Pepper chat fruit viroid</i>	PCFVd
			<i>Tomato apical stunt viroid</i>	TASVd
			<i>Tomato chlorotic dwarf viroid</i>	TCDVd
			<i>Tomato planta macho viroid</i>	TPMVd
	<i>Hostuviroid</i>	CCR + TCH	<i>Hop stunt viroid</i>	HSVd
		CCR + TCR	<i>Dahlia latent virus</i>	DLVd
	<i>Apscaviroid</i>	CCR + TCR	<i>Apple scar skin viroid</i>	ASSVd
			<i>Apple dimple fruit viroid</i>	ADFVd
			<i>Australian grapevine viroid</i>	AGVd
			<i>Citrus bent leaf viroid</i>	CBLVd
			<i>Citrus dwarfing viroid</i>	CDVd
			<i>Citrus viroid V</i>	CVd-V
			<i>Citrus viroid VI</i>	CVd-VI
			<i>Grapevine yellow speckle viroid 1</i>	GYSVd-1
			<i>Grapevine yellow speckle viroid 2</i>	GYSVd-2
			<i>Pear blister canker viroid</i>	PBCVd
			<i>Apscaviroid aclsvd</i>	ACFSVd
			<i>Apscaviroid cvd-VII</i>	CVd-VII
			<i>Apscaviroid dvd</i>	DVd
			<i>Apscaviroid glvd</i>	GLVd
			<i>Apscaviroid lvd</i>	LVd
	<i>Cocadviroid</i>	CCR + TCH	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	CCCvD
			<i>Coconut tinangaja viroid</i>	CTiVd
			<i>Citrus bark cracking viroid</i>	CBCVd
			<i>Hop latent viroid</i>	HLVd
	<i>Coleviroid</i>	CCR	<i>Coleus blumei viroid 1</i>	CbVd-1
		CCR + TCR	<i>Coleviroid cbvd-5</i>	CbVd-5
			<i>Coleus blumei viroid 2</i>	CbVd-2
			<i>Coleus blumei viroid 3</i>	CbVd-3
			<i>Coleviroid cbvd-6</i>	CbVd-6
	<i>Avsunviroidae</i>	<i>Avsunviroid</i>	Caracterizados por un contenido alto de A+U (62%), estructura de varilla.	<i>Avocado sunblotch viroid</i>
<i>Pelamoviroid</i>		Estructura semiramificada estabilizada por bucles	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	PLMVd
			<i>Chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>	CChMVd
<i>Elaviroid</i>		Estructuras de quasi-varillas ramificada con propiedades intermedias entre los otros dos géneros	<i>Apple hammerhead viroid</i>	AHVd
			<i>Eggplant latent viroid</i>	ELVd

Tabla 1: Clasificación de los viroides reportados. Distribución según sus características en ambas familias y sus respectivos géneros (Navarro, 2021; Ortolá y Daros, 2023).

Los criterios para demarcar especies de viroides son similitud de secuencia inferior al 90% en el genoma completo y propiedades biológicas distintas, particularmente rango de hospedantes y síntomas (Di Serio *et al.*, 2014). Los viroides, como los virus, se propagan en sus hospedadores como poblaciones de secuencia estrechamente relacionadas (cuasiespecies), aunque uno o más pueden predominar en la población (Biebricher y Eigen, 2006; Codoñer *et al.*, 2006; Di Serio *et al.*, 2014). Además, se ha visto que el hospedante parece ejercer una presión de selección sobre la población de viroides, es por eso que una población recuperada luego del paso por un determinado hospedante puede presentar algunos cambios (Murcia, 2009). Algunas variantes de viroides con

cambios menores que afectan a ciertas regiones de su secuencia, están directamente relacionadas con enfermedades específicas o con alteraciones dramáticas en la severidad de los síntomas (Flores *et al.*, 2005).

I.5. Replicación y movimiento de los viroides en plantas

El mecanismo de replicación de todos los viroides es por círculo rodante, siendo por la vía asimétrica para la familia *Pospiviroidae*, y por la vía simétrica para la familia *Avsunviroidae*. En la Figura 6 se muestra un esquema de ambas vías (Navarro *et al.*, 2021; Flores *et al.*, 2020; Ortolá y Daros, 2023).

La forma azul sólida corresponde a oligómero de polaridad positiva, mientras que la forma verde abierta corresponde a polaridad negativa. Las flechas negras indican los sitios de procesamiento, y las rojas cómo avanza el mecanismo.

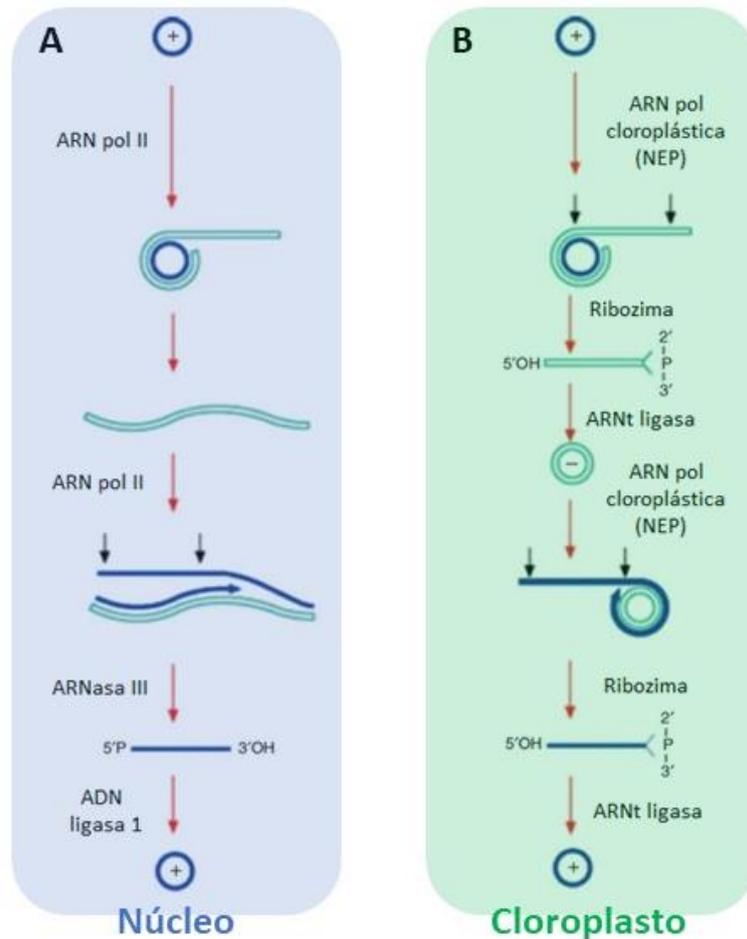


Figura 6: Mecanismo de círculo rodante en sus variantes asimétrica (A) y simétrica (B). La familia *Pospiviroidae* replican en el núcleo por la vía asimétrica comenzando por replicar repetidamente los ARNs circulares de polaridad positiva (+) por una ARN polimerasa II (ARN pol II) del hospedante, produciendo un concatémero lineal de ARN complementario de polaridad negativa (-). Estos entran directamente en un nuevo ciclo de replicación para generar la hebra de polaridad (+), los cuales son procesados (clivados y ligados) por enzimas del huésped (ARNasa III y ADN ligasa I) para generar monómeros del viroide (+). La familia *Avsunviroidae* replican en el cloroplasto siguiendo la vía simétrica. Esta vía genera hebras de polaridad (-) a partir de monómero (+) que son circularizadas, luego ingresa a un nuevo ciclo de replicación para dar una conformación de polaridad (+). Se ha propuesto que la replicación es llevada a cabo por una polimerasa de ARN dependiente de ADN cloroplástica codificada en el núcleo (NEP: *nuclear-encoded RNA polymerase*), la cual genera un concatémero que es procesado por la ribozima presente en sus secuencias generando unidades monoméricas. Luego los monómeros son circularizados por una ligasa ARNt cloroplástica del hospedante (Tomado de Flores *et al.*, 2020). Las hebras de polaridad (+) se grafican en color azul, mientras que las de polaridad (-) son verdes.

Para la familia *Pospiviroidae*, el primer paso es ingresar al núcleo, lo cual hace mediante interacción con proteínas del hospedante que varían según el viroide. Su replicación transcurre en el nucleoplasma y es mediada por la polimerasa de ARN II dependiente de ADN (ARN Pol II) perteneciente al hospedante. Se vio que las hebras con ambas polaridades que se acumulan durante la replicación tienen diferentes ubicaciones, siendo la de polaridad positiva trasladada al nucléolo. Luego son clivados en unidades monoméricas por una ARNasa III, y posteriormente adoptan la conformación de varilla y finalmente son ligados por una ADN ligasa 1 (Flores *et al.*, 2020; Navarro *et al.*, 2021; Ortolá y Daros, 2023).

Por su parte, los viroides de la familia *Avsunviroidae* replican en el cloroplasto, en la membrana tilacoidal, aunque aún se desconoce cómo llegan allí y los factores celulares involucrados; parece estar implicada una señal de localización del viroide en su secuencia o un motivo estructural específico. La vía de síntesis para esta familia es la simétrica, por lo que se generan hebras de polaridad negativa que son circularizadas, y luego esa conformación de polaridad negativa ingresa a un nuevo ciclo de replicación para dar una conformación de polaridad positiva. Se ha propuesto que la replicación es llevada a cabo por una polimerasa de ARN dependiente de ADN cloroplástica codificada en el núcleo (NEP; *nuclear-encoded RNA polymerase*), la cual genera un concatémero que es procesado por la ribozima presente en sus secuencias generando unidades monoméricas. Luego los monómeros son circularizados por una ligasa ARNt cloroplástica del hospedante (Ortolá y Daros, 2023; Navarro *et al.*, 2021; Flores *et al.*, 2020).

I.6. Movimiento de los viroides dentro y fuera de la célula

Para lograr infectar una planta, los viroides deben poder moverse dentro de la célula para replicarse, y luego al resto de la planta para desarrollar una infección sistémica. Aún queda mucho por conocer en cuanto al movimiento dentro de la célula, como se trasladan a través del citoplasma tanto para llegar a las organelas donde se replican, como para el movimiento inverso. Se han propuesto algunos factores del hospedante como parte de este proceso, un ejemplo es Virp1 en el movimiento de PSTVd, e incluso se han reportado algunos motivos puntuales del ARN de PSTVd en relación al movimiento (Flores *et al.*, 2020; Navarro *et al.*, 2021; Ortolá y Daros, 2023).

Para el transporte de célula a célula, los viroides pasan a través de sus plasmodesmos, y luego difunden en la misma planta por el floema, al parecer, siguiendo la misma vía de transporte que los productos fotosintéticos (Flores *et al.*, 2020; Navarro *et al.*, 2021; Ortolá y Daros, 2023). El movimiento depende de su interacción con componentes celulares del hospedante. Cualquier cambio puede afectarlo, es por eso, que el movimiento depende del viroide y la célula hospedante implicados (Ortolá y Daros, 2023).

I.7. Sintomatología y rango de hospedantes de los viroides

Los viroides, en contraste con los virus, no codifican proteínas, por lo que dependen enteramente de los factores del hospedante para completar su ciclo infeccioso (Flores *et al.*, 2005; 2015, 2020). Mayormente infectan plantas dicotiledóneas, aunque hay algunas excepciones donde infectan monocotiledóneas, como lo son CCVd y CTiVd que infectan *Cocos nucifera*, o DVd que afecta a *Dendrobium officinale*. Además, algunos viroides tienen un amplio rango de hospedantes, mientras que la mayoría están restringidos a sus hospedantes naturales. Generalmente, la familia *Pospiviroidae* produce síntomas tardíos, no específicos y sistémicos, mientras que los *Avsunviroidae* son más tempranos, específicos y locales. La patogenicidad del viroide depende de su genoma, de la planta hospedante, y de las condiciones de incubación (Ortolá y Daros, 2023); es por eso que un mismo viroide puede generar distintos síntomas en hospedantes diferentes. Los síntomas también varían según si los viroides se encuentran solos o en infecciones mixtas (Duran-Vila, 1997).

Los viroides dan una amplia gama de síntomas, desde infecciones asintomáticas, hasta la muerte de la planta. Entre los síntomas que se pueden ver esta la epinastia o curvatura de las hojas, clorosis de las hojas, deformación de flores, frutas y/o órganos de reserva, agrietamiento de tallo y corteza, retraso del crecimiento, enanismo, etc. (Figura 7). En un nivel subcelular, inducen deformaciones de la pared celular y cloroplastos, y acumulaciones anormales de metabolitos en citoplasma o cloroplasto.

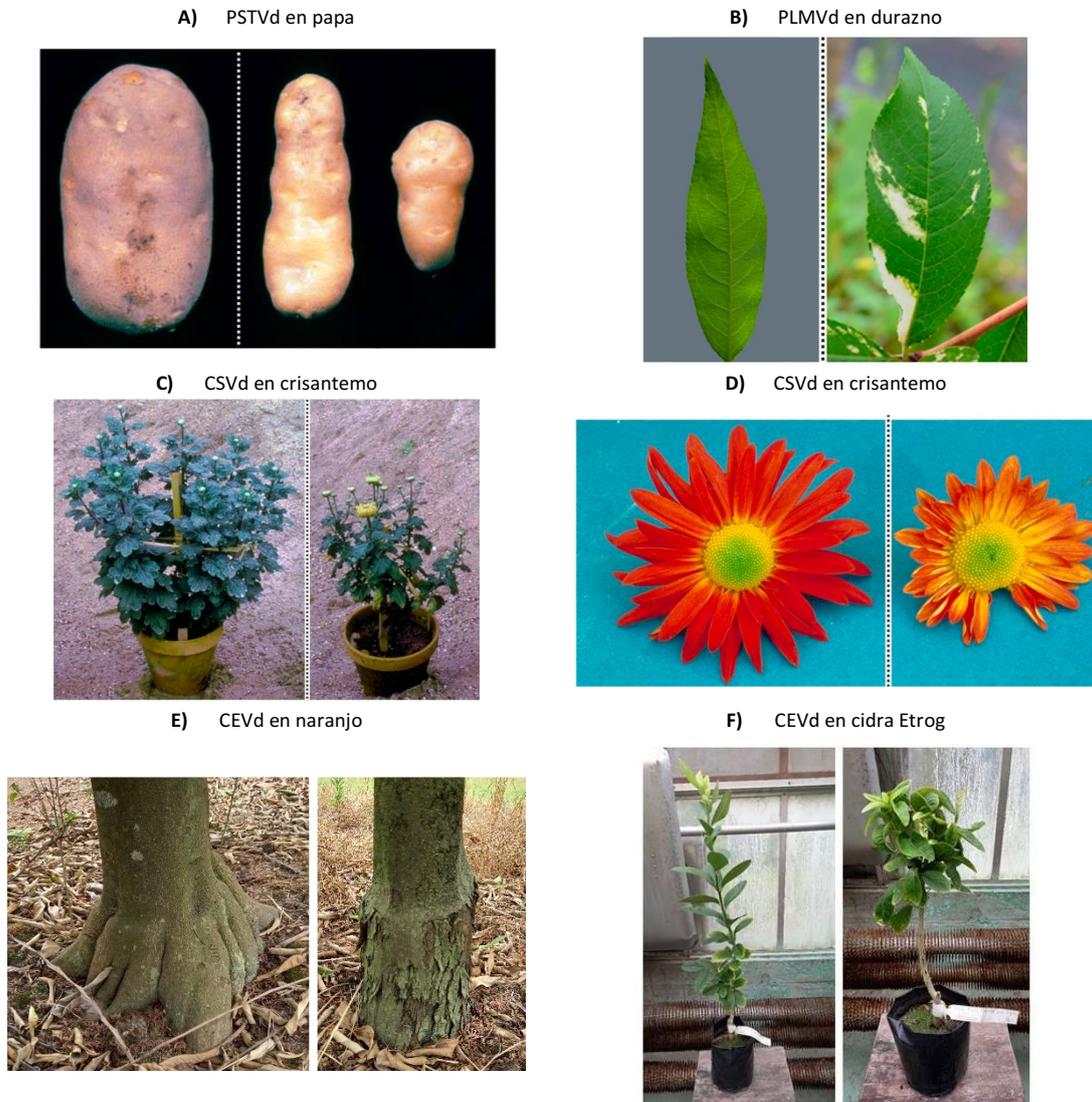


Figura 7: Síntomas típicos de infecciones por viroides en diferentes cultivos. Se muestra a la izquierda sin síntomas y a la derecha con síntomas: A) PSTVd induce malformaciones en el tubérculo de la papa; B) PLMVd induce clorosis severa en hojas de durazno; C) CSVd produce retraso del crecimiento y floración temprana en crisantemo, resultando en deformación y rotura de flores (D) (Fotografías A, B, C y D tomadas de Ortolá y Daros, 2023); E) CEVd induce descortezado en el pie; F) CEVd induce reducción del crecimiento y epinastia* en cidra Etrog.

*Epinastia es un síntoma de plantas en el que las hojas experimentan un aumento o disminución en el crecimiento de una de las caras, provocando la curvatura hacia abajo (Roistacher, 1991).

I.8. Transmisión

La forma más efectiva de transmisión que tienen los viroides es a través de propagación vegetativa, ya sea por injerto y/o enraizamiento de tubérculos, rizomas, o bulbos infectados. En

segundo lugar, se ubica la transmisión mecánica, principalmente durante la manipulación o cuidado de las plantas, en la poda o cosecha, al utilizar herramientas sin desinfección. Los viroides poseen un alto grado de tolerancia al calor y a tratamientos químicos, excepto al hipoclorito de sodio que ha demostrado ser eficaz en la desinfección de las herramientas. No hay evidencia de transmisión de viroides por semillas en cítricos, pero si se informaron tasas variables de transmisión por semillas en especies herbáceas. Hay otros estudios que sugieren la transmisión por las raíces, lo cual fue probado bajo condiciones experimentales en invernáculo, pero no a campo (Umaña Castro, 2010; Ortolá y Daros, 2023).

I.9. Viroides de los cítricos

Los viroides que afectan a los cítricos pertenecen a la Familia *Pospiviroidae*, y dentro de la misma se encuentran distribuidos en diferentes géneros. Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV: <https://ictv.global/>) son:

- *Citrus Exocortis viroid* (CEVd)
- *Hop stunt viroid* (HSVd)
- *Citrus dwarfing viroid* (CDVd)
- *Citrus bent leaf viroid* (CBLVd)
- *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd)
- *Citrus viroid V* (CVd-V)
- *Citrus viroid VI* (CVd-VI)
- *Apscaviroid cvd-VII* (CVd-VII)

En los principales países productores cítricos se ha reportado la presencia de algunos viroides, pero no de todos. En China, primer productor mundial de cítricos, se reportó la presencia de CEVd, HSVd, CBCVd, CBLVd y CVd-V (Parakh *et al.*, 2017). Por su parte, en Argentina, se ha reportado la presencia de CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd en el noroeste del país (Palacios *et al.*, 2019), y en la zona cítrica del Río Uruguay se ha reportado la existencia de CEVd, HSVd y CDVd. Esta información es resultado de un estudio de alcance limitado (Plata *et al.*, 2002) por lo tanto al momento del comienzo del presente trabajo de tesis no se podía asegurar que no se encuentren los restantes viroides.

I.9.1. *Citrus Exocortis viroid*: CEVd

Fue el primer viroide de cítricos reportado por lo que es el viroide más estudiado y causante de una importante enfermedad denominada *Exocortis*, la cual genera descortezado en el pie y enanismo en portainjertos sensibles (Figura 8). Dicha enfermedad fue descrita en 1948 como un trastorno de descamación de la corteza que afectaba a los árboles de cítricos injertados sobre naranjos trifoliados (*Poncirus trifoliata* o *Citrus trifolio*). En un principio se creía que su origen era viral hasta que se describieron los viroides en el año 1971. La importancia económica de esta enfermedad depende fundamentalmente de la respuesta de las especies y variedades de interés injertadas sobre portainjertos sensibles, que pueden presentar reducción del tamaño de los árboles

y de la producción de fruta (Duran-Vila, 2017). Hasta el momento, se han reportado como sensibles a CEVd tanto variedades de interés comercial como portainjertos pertenecientes al género *Citrus*.

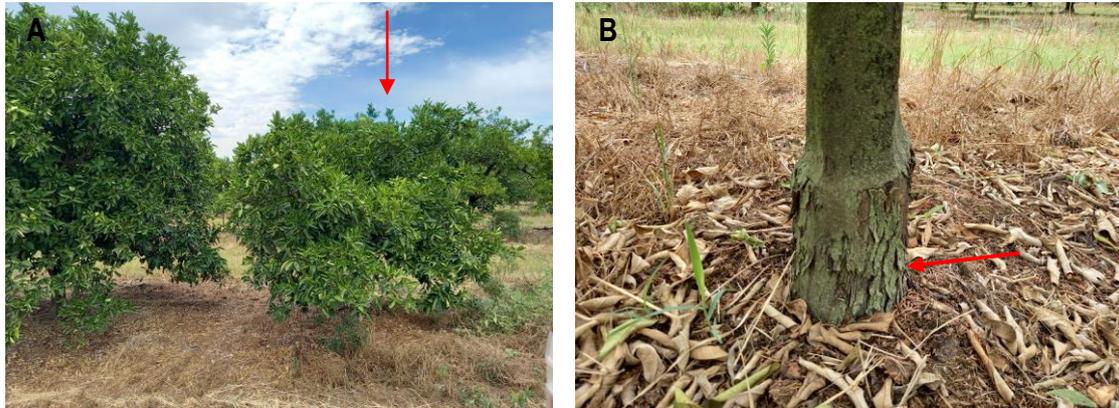


Figura 8: enanismo (A) y descortezado en el pie (B) provocados por CEVd sobre plantas de naranja Salustiana injertadas sobre *Poncirus trifoliata*. Con flechas rojas se señalan los síntomas mencionados.

CEVd posee una secuencia de 370-375 nucleótidos con una estructura secundaria en forma de varilla con el 67% de bases apareadas. Este viroide, asignado al género *Pospiviroid*, tiene una amplia gama de hospedantes naturales y experimentales, dentro de los que se incluyen tanto especies sintomáticas como asintomáticas. Como hospedantes naturales se cita la vid, los cítricos y varias especies hortícolas como tomate (*Lycopersicon esculentum*), rábano blanco (*Brassica rapa rapa*), berenjena (*Solanum melongena*), zanahoria (*Daucus carota*) y haba (*Vicia faba*); mientras que como hospedantes experimentales hay varias especies de hortalizas e incluso ornamentales, como lo son *Gynura aurantiaca*, crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), *Verbena* spp., petunia, *Solanum jasminoides*, pepino (*Cucumis sativus*), entre otros (Murcia, 2009; Serra, 2009).

1.9.2. Hop stunt viroid: HSVd

Pertenece al género *Hostuviroid*, siendo HSVd la especie tipo del género. Es un viroide que fue identificado por primera vez en plantas de lúpulo (*Humulus lupulus*) (Figura 9) según lo reportado por Sasaki y Shikata en 1977, pero afecta además otros cultivos. Ha sido detectado en árboles de vid y cítricos en todo el mundo, y en ciruela y melocotón presenta síntomas como frutos moteados o amarillos. Se sabe que HSVd se distribuye en plantas frutales de las familias Moraceas (higuera y morera), Rosáceas (almendra, manzana, albaricoque, cereza, melocotón, pera y ciruela) y Rutáceas (*Citrus* spp.), siendo el viroide con mayor gama de hospedantes naturales. Muchas plantas hospedantes son portadoras asintomáticas, pero algunas pueden expresar síntomas por ser hospedantes sensibles y/o mostrarlos frente a ciertas variantes específicas. Existen variantes de esta especie con diferentes movilidades electroforéticas, con tamaños que rondan los 294-305 nucleótidos (Hataya *et al.*, 2017; Marquez-Molins *et al.*, 2021).



Figura 9: Plantas de lúpulo con síntomas provocados por HSVd. Se señalan con flechas rojas las plantas con enanismo (Tomado de Radišek, 2013).

Este viroide es causante de varias enfermedades en distintos cultivos, como lo son *hop stunt* en lúpulo que implica reducción del crecimiento, desórdenes en frutas de hueso (ciruela, durazno), la enfermedad de la fruta pálida en pepino y caquexia en cítricos sensibles (Hataya *et al.*, 2017). Los síntomas de caquexia incluyen acanaladuras en la madera del portainjerto de los árboles injertados, que puede estar impregnadas de goma. Inicialmente, caquexia fue descrita como una enfermedad de origen vírica descubierta en mandarinas pero que también afecta a híbridos de mandarinas, tangelos, limas, kunquats y a *Citrus macrohylla*. Aunque la enfermedad de caquexia puede ser encontrada en la mayoría de las regiones cítricas del mundo, muchas variedades, incluidos pomelo, naranja dulce y limón son portadores asintomáticos del agente. Existen aislamientos leves, moderados y severos del viroide. Los severos hasta pueden ser letales para los cítricos sobre pie susceptible (Semancik *et al.*, 1988; Reanwarakorn y Semancik, 1999).

La primera vez que se identificó HSVd en cítricos, se lo referenciaba como un grupo de ARNs tipo viroides asociados a la enfermedad Exocortis. Estos ARNs presentaban movilidades electroforéticas distintas a CEVd, siendo de menor tamaño, y presuntamente asociadas a las formas leves y moderadas de la enfermedad. Algunos años después, se obtuvo la secuencia nucleotídica de dos variantes a las que se denominó CVd-IIb y CVd-IIa, con tamaños de 299 y 302 nucleótidos, respectivamente, verificando que era otra especie. Ambas secuencias compartían una identidad de secuencia del 98% entre sí (Sano *et al.*, 1988; Murcia, 2009; Serra, 2009).

El Grupo CV-II de viroides primero se descubrió que estaba conformado por las dos variantes, CVd-IIa y CVd-IIb, la primera no causante de Caquexia en cítricos y la segunda sí. Con el avance de investigaciones unos años después se descubrió una tercera variante mientras se analizaba

unas plantas con Caquexia en la Universidad de California en Riverside, y se decidió llamarla CVd-IIc. Si bien vieron que inducía síntomas más moderados en mandarina Parson Special, decidieron considerarla junto a CVd-IIb como agentes causantes de la enfermedad (Semancik y Duran-Vila, 1991). Mandarina Parson Special es la planta utilizada por preferencia para el diagnóstico biológico de HSVd y/o caquexia (Roistacher, 1991; Nie y Singh, 2017).

I.9.3. *Citrus dwarfing viroid: CDVd*

El viroide del enanismo de los cítricos (CDVd), anteriormente llamado CVd-III, pertenece al género *Apscaviroid*, y tiene un rango de hospedantes restringido al género *Citrus*. Como hospedante experimental se utiliza cidra Etrog al cual provoca arrugamiento del peciolo y necrosis acompañada de caída de hojas y ocasional epinastia (Figura 10 de A - E). En cítricos injertados sobre *Poncirus trifoliata* provoca enanismo. Este viroide, junto con CEVd y HSVd, está presente en todos los países productores de cítricos (Serra, 2009; Murcia, 2009; Tessitori, 2017).

La secuencia del CDVd tiene un tamaño de entre 294-297 nucleótidos de longitud. Se han reportado tres variantes, CVd-IIIa, CVd-IIIb y CVd-IIIc con tamaños de 297, 294 y 291 nucleótidos respectivamente (Rakowsky *et al.*, 1994; Stasys *et al.*, 1995, y Semancik *et al.*, 1997). Estas tres secuencias difieren en tan sólo 18 nucleótidos localizados a la izquierda y derecha del CCR (Murcia, 2009; Serra, 2009; Tessitori, 2017).

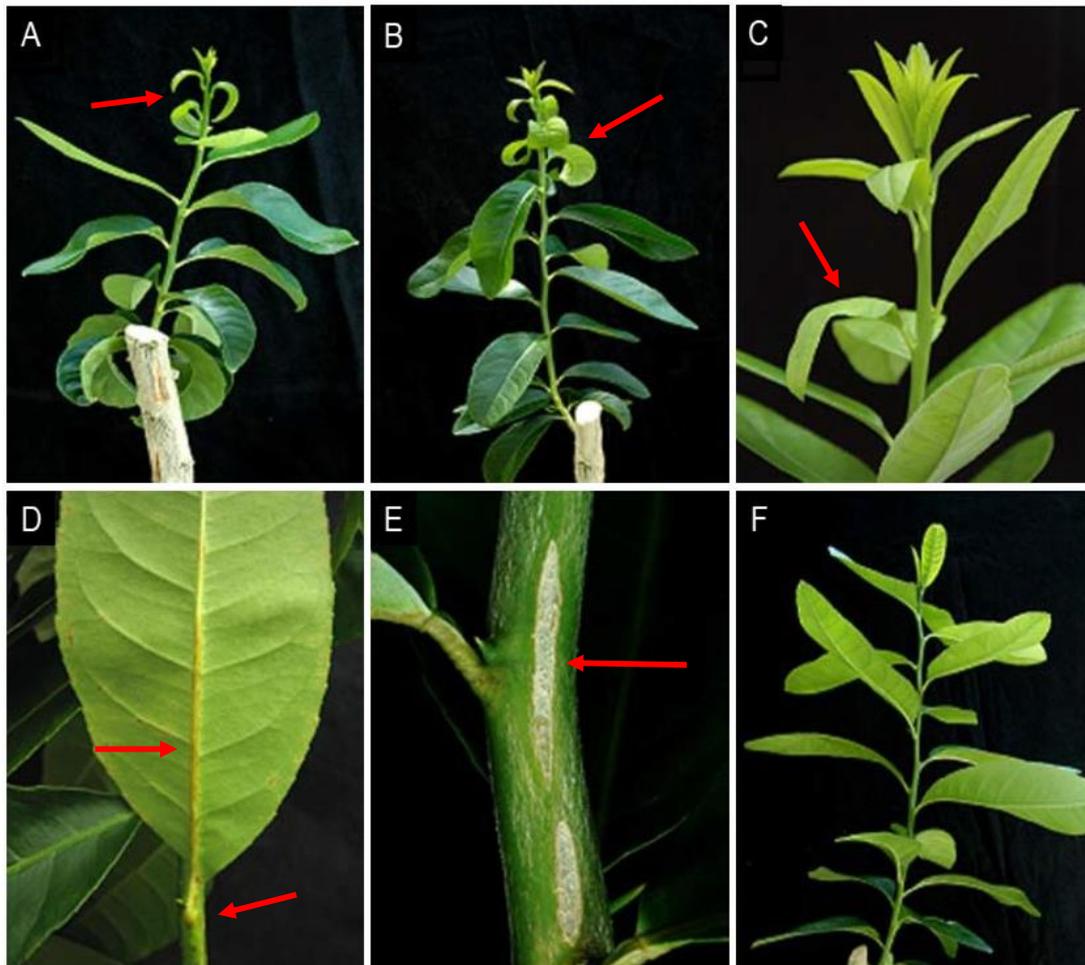


Figura 10: Síntomas observados en cidra Etrog infectados con distintos aislamientos de CDVd: epinastia en hojas generadas por IIIa (A), IIIb (B) y IIIc (C); peciolo y nervadura central con necrosis (D); grietas en el tallo principal que pueden extenderse a toda la planta (E). Planta control sin inocular, hojas sin síntomas (F) (Tomado de Murcia, 2009).

1.9.4. *Citrus bent leaf viroid: CBLVd*

El viroide de la hoja curvada de los cítricos (CBLVd), antes llamado citrus viroid I (CVd-I), posee un tamaño aproximado de 320-330 nucleótidos, y pertenece al Género *Apscaviroid*. Según los primeros reportes, se vio que la población de este viroide está conformada principalmente por dos variantes, CVd-Ia y CVd-Ib. Se lo ha encontrado siempre infectando naturalmente la familia de las Rutáceas, característica que comparte con CDVd y CVd-V, aunque se logró transmitir desde *Citrus macrophylla* a palta (*Persea americana* West Indian) mediante injerto de un fragmento de corteza, por lo que puede infectar otros cultivos. En la especie indicadora cidro Etrog, este viroide produce necrosis puntuales en la nervadura central que causa epinastia en las hojas a veces acompañada de exudaciones de goma en el tallo y ramas, y pérdida de dominancia apical (Murcia, 2009; Serra, 2009; Tessitori, 2017).

A diferencia de CDVd, las variantes de CBLVd están menos extendidas, aunque han sido reportadas en casi todos los países productores de cítricos (Tessitori, 2017; Palacios *et al.*, 2019).

1.9.5. *Citrus bark cracking viroid: CBCVd*

El viroide de la corteza agrietada de los cítricos (CBCVd), anteriormente identificado como CVd-IV, pertenece al género *Cocadviroid*. Es el viroide de cítricos con mayor movilidad electroforética por ser el de menor tamaño, entre 282-284 nucleótidos. Originalmente se lo asociaba sólo a los cítricos, pero en 2015 se reportó por primera vez infecciones de gran incidencia causadas por CBCVd en lúpulo (Figura 11 A), donde indujo síntomas severos, afectando el crecimiento vegetativo y la producción. También se ha utilizado *Benincasa hispida* (conocida como calabaza blanca o calabaza china) como hospedador alternativo, aunque sin expresión de síntomas. Los cítricos siguen siendo los principales hospedantes de este viroide donde induce agrietamiento en la corteza sobre *Poncirus trifoliata* (L.) (Figura 11 B) y los híbridos citrange (*P. trifoliata* x *C. sinensis*). Los plantines de cidra Etrog inoculados con CBCVd pueden presentar un leve retraso en el crecimiento, necrosis en la nervadura central y epinastia foliar, aunque la sintomatología que causa es mucho más leve que CEVd (Umaña Castro, 2010; Jakse *et al.*, 2015; Lavagi *et al.*, 2017).

CBCVd es un viroide altamente conservado, compartiendo un fragmento de 80-90 nucleótidos en el dominio V y en el dominio TR con CEVd, y en la región terminal izquierda con HSVd por lo que se considera como un recombinante natural, lo que podría explicar porque este viroide infecta tanto citrus como lúpulo. A pesar de esta similitud, CBCVd pertenece al género *Cocadviroid* debido a la secuencia de su CCR y la de su TCH (Umaña Castro, 2010; Lavagi *et al.*, 2017; Murcia, 2009; Serra, 2009).

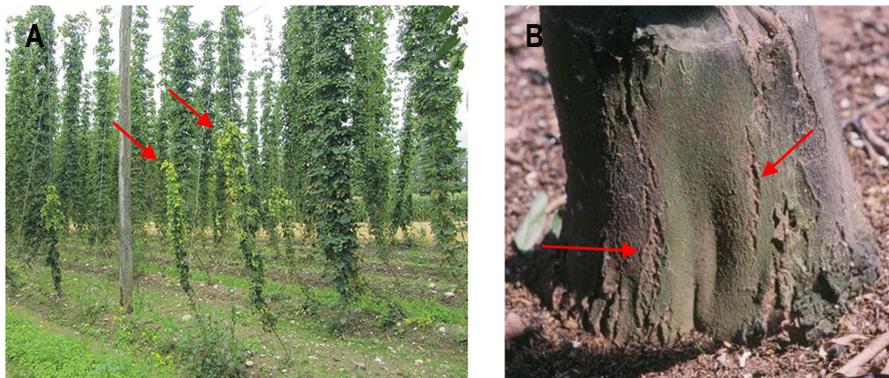


Figura 11: Síntomas de CBCVd en lúpulo (A) y en *Poncirus trifoliata* (B). Se marcan con flechas los síntomas mencionados, respectivamente (Tomado de Lavagi *et al.*, 2017).

1.9.6. *Citrus viroid V: CVd-V*

Este viroide pertenece al Género *Apocaviroid* ya que contiene la CCR y la TCR típicas de los miembros de este género, y su tamaño es de 294 nucleótidos presentando una movilidad electroforética similar a HSVd y CDVd. Naturalmente está restringido a cítricos sin éxitos de transmisión a especies herbáceas. Desde su descubrimiento en California, Estados Unidos, su dispersión fue en aumento, habiéndose reportado también en otras regiones productoras de cítricos del mundo como España, Nepal, Oman, etc. Tiene una amplia gama de hospedantes dentro de los cítricos, ya que se ha logrado transmitir a naranjo dulce, mandarino y sus híbridos clementina, satsuma, limón, lima dulce de Palestina, lima Tahití, naranjo agrio, calamondin, bergamota y kumquat (Murcia, 2009; Tessitori, 2017).

I.9.7. *Citrus viroid VI: CVd-VI*

También conocido anteriormente como CVd-OS por “Original Source”, es un viroide perteneciente al género *Apscaviroid* cuyo tamaño es de 330 nucleótidos. A diferencia de los otros viroides de cítricos con los que comparte género, CVd-VI infecta cítricos y también caqui japones (*Diospyros kaki Thunb.*). Presenta el CCR característico de los miembros del género *Apscaviroid* y una similitud de secuencia del 68% con CDVd. Se considera un viroide quimérico pues presenta también similitud de secuencia con ADFVd (*Apple dimple fruit viroid*) en los dominios C y T_L, y con CEVd en los dominios V y T_L. Se ha detectado en variedades de naranjo dulce, en tangor (*C. reticulata* x *C. sinensis*) y en el híbrido Shiranui (*C. reticulata* x *C. sinensis*) x *C. reticulata*) únicamente en Japón. En cidro Etrog causa necrosis leve en el pecíolo y epinastia leve en hojas. Originalmente fue identificado en una mezcla compleja de viroides en una planta cítrica en Japón, y hasta la fecha parece estar restringido a ese país (Umaña Castro, 2010; Tessitori, 2017; Murcia, 2009; Serra, 2009).

I.9.8. *Apscaviroid cvd-VII: CVd-VII*

Es el último viroide de cítricos reportado y aceptado por el ICTV en el año 2021 donde se le asignó el nombre *Apscaviroid cvd-VII*, ya que previamente se lo había nombrado Citrus viroid VII. Esta nueva especie pertenece al género *Apscaviroid* de la familia *Pospiviroidae*. Está relacionado filogenéticamente con el *grapevine yellow speckle viroid 1* y el *grapevine speckle viroid 2* (AGVd 1 y 2). Posee un tamaño de 368 nucleótidos, mostrando una identidad de secuencias menor al 90% con otros miembros del género *Apscaviroid*, por lo que se lo propuso como una nueva especie. Fue descubierto en un árbol de limón Lisbon asintomático (*Citrus x limon* L. Burm.f.) en Nueva Gales del Sur, Australia (Chambers *et al.*, 2018).

Las infecciones por viroides pueden generar pérdidas económicas significativas en los frutales. Los viroides de cítricos inducen enfermedad solo cuando un viroide específico (o variante) infecta a un hospedero sensible. De todos los viroides de cítricos conocidos, solo dos, CEVd y HSVd, son los que se han asociado con enfermedades que pueden causar pérdidas económicas. Tanto la exocortis como la cachexia pueden reducir el rendimiento en árboles de cítricos comerciales y económicamente importantes, como lo es la naranja trifoliada (*Poncirus trifoliata*) utilizada como portainjerto, y en las mandarinas (*Citrus reticulata* Blanco). No hay muchos reportes sobre las pérdidas económicas que ocasionan, pero en 1996, Roistacher y colaboradores analizaron árboles infectados por viroides que mostraban declive y grietas severas en la corteza, los cuales generalmente producían una cuarta parte (10.2 kg) o menos por árbol en comparación con los árboles sanos, que producían 40.8 kg. Además, los patrones de injerto que mostraban grietas severas en la corteza estaban predispuestos a infecciones por *Phytophthora* al presentar los tejidos vasculares expuestos. Los árboles de mandarina infectados con cachexia son enanos, cloróticos, con impregnaciones de goma en el floema, presentando también un rendimiento altamente reducido (Hadidi *et al.*, 2017).

En contraposición a lo expuesto en el párrafo anterior, se ha implementado el uso de algunos viroides para la producción de árboles cítricos enanos y así, al reducir el tamaño de la copa, ayudar al manejo del cultivo y de las enfermedades, y el monitoreo de plagas (Hadidi *et al.*, 2017).

I.10. Métodos de diagnóstico de viroides

Las metodologías convencionales ya existentes para el diagnóstico de viroides pueden ser de tipo biológico o molecular.

I.10.1. Métodos biológicos:

La primera metodología implementada para el diagnóstico de viroides de cítricos fue el *indexing* biológico, utilizando como planta indicadora cidra Etrog (*Citrus medica* L.), y/o mandarina Parson Special principalmente (Nie y Singh, 2017). Este método se basa en la utilización de plantas indicadoras susceptibles, que acumulan en mayores concentraciones al patógeno, provocando la expresión de síntomas característicos que indican su presencia (Umaña Castro, 2010; Lee *et al.*, 2021). En el caso particular de los viroides, un ensayo biológico no permite diferenciar la especie, sólo permite definir si están o no presentes. Las infecciones de viroides pueden ser simples o mixtas, y los síntomas que generan ambos tipos de infecciones en general son similares, sólo que al estar en mezclas pueden presentar sinergismos y/o antagonismos, distorsionando los síntomas más característicos de algunos viroides en particular, y alterando el diagnóstico visual basado en síntomas foliares (Umaña Castro, 2010).

Los métodos biológicos son técnicas de diagnóstico con largos periodos de incubación (3-24 meses) en la planta y en condiciones controladas de luz y temperatura (Umaña Castro, 2010). Para viroides de cítricos, el indicador más utilizado es cidra Etrog (*Citrus medica*) de la selección Arizona 861-S-1 injertado sobre limón rugoso (*Citrus × jambhiri* Lush.), que induce sintomatología característica frente a infecciones por viroides, que consiste principalmente en amarronamiento de peciolo y nervaduras, reducción del crecimiento, epinastia en hojas y acumulación de goma debajo de la corteza. Este hospedante es inoculado con fragmentos de corteza proveniente de la planta a evaluar, o con extractos de ARN de plantas infectadas, y luego, se las debe incubar por un mínimo de 3 meses bajo condiciones controladas de temperatura a 28-32°C. Los síntomas característicos de viroides con un grado severo de manifestación, asociados con algunos viroides, generalmente aparecen en 4 o 10 semanas cuando las cidras inoculadas se mantienen en condiciones óptimas. Cuando el viroide o la variante presente provoca una sintomatología leve, requieren de más tiempo, entre 3 a 6 meses, para la manifestación y la correcta visualización. En todo ensayo biológico además se debe contar con controles positivos, negativos y asegurar un correcto estado nutricional de las plantas indicadoras, así como también verificar las condiciones ambientales del invernadero durante el desarrollo del ensayo (Roistacher, 1991).

Un ensayo biológico es un método laborioso que además del tiempo, requiere de instalaciones y equipamiento adecuado para lograr las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de las plantas indicadoras, y de personal capacitado para el cuidado de las plantas y la observación de síntomas. Es por eso que son varios los factores que afectan la correcta expresión de los

síntomas asociados con el viroide, la cual también está influenciada por el título del viroide en el inóculo (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2017).

Si bien las metodologías moleculares ofrecen un diagnóstico de viroides rápido, económico y fiable, y son de utilidad para la detección de viroides que no generan síntomas en plantas, así como para la identificación de nuevos viroides, no sirven para determinar las propiedades biológicas como la infectividad y la patogenicidad del viroide. En este sentido, el diagnóstico biológico es complementario a las metodologías moleculares de detección e identificación, siendo ampliamente usado para los análisis de caracterización y patogénesis, así como para la clasificación de especies de viroides (Nie y Singh, 2017).

I.10.2. Métodos moleculares:

Dentro de las metodologías basadas en biología molecular se encuentran la electroforesis en poliácridamida secuencial o sPAGE (*sequential polyacrylamide gel electrophoresis*), la hibridación molecular, y la RT-PCR en tiempo final o tiempo real.

I.10.2.1. Electroforesis secuencial (sPAGE)

La metodología sPAGE es una técnica muy utilizada para la identificación preliminar de viroides y para su caracterización. El método se basa en las propiedades moleculares específicas de estos patógenos pequeños de ARN, circulares, monocatenarios con una estructura secundaria fuerte, dando como resultado patrones de separación específicos en geles. Es una metodología confiable para identificar y aislar viroides (Hanold y Vadamalai, 2017), con buena repetibilidad y reproducibilidad.

La metodología consiste en dos geles consecutivos, el primero en condiciones nativas y el segundo en condiciones desnaturizantes. En la primera electroforesis, los ARN de viroides circulares no desnaturizados migran como estructuras parcialmente apareadas en geles nativos, logrando en esta etapa la separación de otras moléculas de ARN presentes de la planta, pero no separar los viroides por tamaño. En la segunda electroforesis, las estructuras como círculos abiertos bajo condiciones desnaturizantes, provocan una marcada disminución de la movilidad en relación con las moléculas lineales desnaturizadas, que pueden mostrar el mismo tamaño aparente en condiciones nativas pero que se separan en condiciones desnaturizante (Figura 12). Esta variación en la movilidad electroforética es la que se utiliza para la separación y detección eficiente de moléculas circulares como lo son los viroides, ARN satélite circular y moléculas de ADN circulares de virus monocatenarios, incluso en mezclas complejas de ácidos nucleicos. Además, el uso de tinción con nitrato de plata permite un poder de resolución superior para moléculas pequeñas, el cual puede detectar pequeñas cantidades como 50 pg de ARN por banda (Roistacher, 1991; Umaña Castro, 2010; Hanold y Vadamalai, 2017).

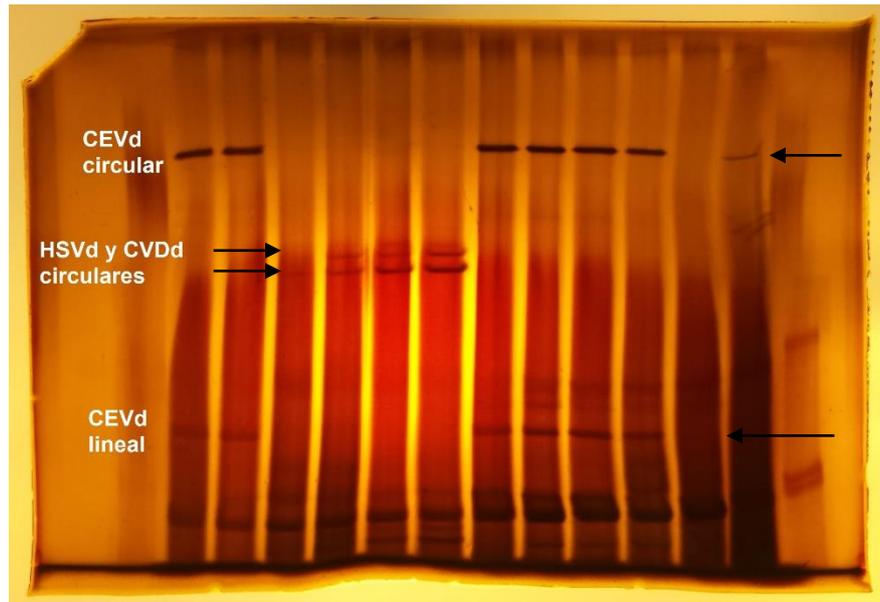


Figura 12: PAGE desnaturalizante donde se marcan los diferentes viroides de cítricos en su conformación circular y/o lineal, y la diferencia de migración entre CEVd, HSVd y CVDd.

I.10.2.2. Hibridación molecular

La técnica de hibridación molecular detecta el ácido nucleico del viroide específicamente por reconocimiento de su secuencia de nucleótidos. El apareamiento específico de los nucleótidos constituye la base para la formación de los híbridos entre moléculas complementarias, y esto permite hacer uso de la hibridación molecular como técnica de diagnóstico (Roistacher, 1991; Pallás *et al.*, 2017). En esta técnica, la hibridación molecular se realiza sobre un soporte sólido, puntualmente las muestras son inmovilizadas sobre una membrana de nitrocelulosa y el híbrido se formará entre el viroide que buscamos detectar y una sonda marcada. La sonda utilizada es una molécula de ácido nucleico (ADN o ARN) simple hebra preparada a partir del ácido nucleico del propio viroide (Roistacher, 1991; Pallás *et al.*, 2017). Las mismas pueden marcarse mediante la incorporación de isótopos radioactivos o marcadores no radiactivos, tales como la biotina, digoxigenina, etc., que permitirán visualizar la formación del híbrido. Existen variaciones en esta técnica al variar el soporte utilizado, aunque su fundamento es el mismo (Roistacher, 1991; Umaña Castro, 2010; Pallás *et al.*, 2017).

Actualmente, en Argentina no está habilitada para su uso en la detección de viroides de cítricos por el Programa Nacional de Certificación de Cítricos fiscalizado por el Instituto Nacional de Semillas (INASE) (Resolución N° 479/2023) y en muchos laboratorios ha sido reemplazada por la RT-PCR. En otros sigue siendo utilizada para compatibilizar la sensibilidad y especificidad con el tiempo y el costo (Pallás *et al.*, 2017).

I.10.2.3. RT-PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que permite amplificar el ADN de una muestra. Para el caso de viroides, se utiliza la variante RT-PCR, requiriendo de retrotranscripción (RT) para copiar el ARN del viroide a ADN. Si bien es una técnica

muy utilizada por su sensibilidad y especificidad, tiene algunas desventajas como la necesidad de conocer la secuencia del patógeno para poder diseñar los cebadores que serán los que definen la región a amplificar. Algunos viroides del mismo género presentan alta similitud de secuencias en la región CCR, zona utilizada para diseñar la mayor parte de los cebadores por ser conservada, es por eso que es muy importante la elección de la región a amplificar y la temperatura de hibridación para evitar apareamientos inespecíficos. Otra desventaja es la presencia de inhibidores de la PCR en la extracción de ARN lo que puede dar lugar a falsos negativos. Por este motivo, es muy importante y crítico optimizar el protocolo de extracción de ARN de manera de minimizar la cantidad de inhibidores como polifenoles y polisacáridos, además de contar con controles internos para la PCR (Roistacher, 1991; Umaña Castro, 2010; Faggioli *et al.*, 2017).

La variante RT-PCR en tiempo real, o RT-qPCR, se prefiere por su alta sensibilidad y porque elimina la necesidad de un paso de electroforesis posterior al ciclado y esto disminuye el riesgo de contaminaciones. Además, la metodología permite una cuantificación precisa y facilita la detección de viroides incluso en bajas concentraciones, necesitando así menor cantidad de ARN inicial. Estas ventajas hacen de la RT-qPCR una opción más eficiente, rápida y menos laboriosa.

I.10.2.4. Microarrays

El principio de esta técnica es el apareamiento de las bases por complementariedad de las secuencias por hibridación, donde el ADN o ARN blanco (previamente tratado y etiquetado) hibrida a un fragmento de ADN específico complementario (sonda) inmovilizada y espacialmente ordenada en un soporte sólido. Previo a la hibridación, las muestras de ADN o ARN a testear son etiquetadas por una reacción enzimática con un compuesto fluoróforo o quimiorreactivo. Esta reacción permite luego identificar si la hibridación ocurrió. La utilidad de los microarrays es la detección múltiple y simultánea de patógenos de plantas. Para esta técnica, se debe seleccionar las secuencias a marcar para el microarray; las mismas pueden derivar de la región altamente conservada dentro de las familias, géneros o especies de viroides. Es por eso, que los viroides individuales que no están explícitamente representados en el microarray pueden aún ser detectados, incrementando la posibilidad de que esta técnica pueda ser usada en el descubrimiento de nuevo viroides, especialmente aquellos involucrados en enfermedades de plantas de cierta etiología incierta. Algunos de los viroides detectado por microarray son PSTVd en papa (Agindotan y Perry, 2008), CEVd y CDVd en citrus (Zhang *et al.*, 2013) y CLVd en tomate (Tiberini y Barba, 2012), entre otros (Zhu *et al.*, 2017).

I.10.2.5. NGS: Next Generation Sequencing technologies

A finales del siglo XX y principios del XXI se desarrollaron nuevos métodos de secuenciación. Estos nuevos métodos se conocen como secuenciación de nueva generación (*Next Generation Sequencing*: NGS por sus siglas en inglés), también llamados de alto rendimiento o profunda, y su uso desde 2004 ha cambiado el enfoque tanto de la investigación básica como aplicada en muchas disciplinas biológicas, incluyendo la virología de plantas. La NGS permite producir grandes cantidades de lecturas de ADN de longitudes entre 25 y 400 pb, que son más cortas que las lecturas tradicionales de secuenciación Sanger (300-750 pb). El mayor avance ofrecido por la NGS

es la capacidad de generar un volumen enorme de datos, así como su capacidad para proporcionar información genómica rápida, rentable y precisa.

La NGS puede proporcionar miles a millones de lecturas de secuencias de vd-sRNA (pequeños ARN derivados de viroides producto del silenciamiento génico, mecanismo de defensa de la planta) a partir de materiales de plantas infectadas con viroides. Cuando los vd-sRNA son lo suficientemente abundantes, se pueden ensamblar fragmentos moleculares de viroides. Dado que los vd-sRNA tienen una longitud de 21-24 nt, sus secuencias se pueden emplear directamente como secuencias de cebadores para amplificar fragmentos de viroides mediante RT-PCR (Barba y Hadidi, 2017).

Sobre la base del conocimiento existente de las especies de viroides que mundialmente infectan plantas cítricas, detalladas anteriormente, se propone en el presente trabajo de tesis caracterizar las poblaciones de viroides en la región citrícola del Río Uruguay, colectando información importante sobre su prevalencia, distribución y diversidad genética. Esto permitirá mejorar las herramientas de diagnóstico existentes para una detección temprana y precisa de las infecciones por viroides, facilitando la implementación de medidas de control y prevención oportunas. La información generada contribuirá además a los programas de saneamiento de germoplasma local, aportando a la implementación de medidas de cuarentena y selección de material vegetal libre de viroides, para la producción de plantas cítricas sanas y de alta calidad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La identificación y caracterización biológica y molecular de los viroides en la región citrícola del Río Uruguay permitirá obtener información epidemiológica y estudiar las características de severidad de variantes ya descritas además del posible descubrimiento de nuevas variantes. Esta información será de gran utilidad para el mejoramiento de las herramientas de diagnóstico actuales, y a su vez permitirá realizar un aporte al conocimiento de estos agentes y a los programas de saneamiento de germoplasma local.

Con dicha hipótesis, se diseñó el plan de trabajo con los siguientes objetivos.

OBJETIVOS GENERALES

- Identificar las poblaciones de viroides existentes en la actualidad en la región citrícola del Río Uruguay.
- Analizar las características de severidad de las variantes de viroides existentes y/o nuevas.
- Caracterizar los determinantes de patogenicidad de las variantes halladas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Recolección de muestras, identificación y aislamiento de viroides:

1.A. Selección de áreas representativas de la región citrícola del Río Uruguay y recolección de muestras de plantas cuya sintomatología sugiera la presencia de viroides.

1.B. Identificación de viroides.

1.C. Aislamiento de los diferentes viroides encontrados para realizar la caracterización biológica y molecular.

2. Caracterización molecular y biológica de los viroides encontrados

2.A. Estudio de los cambios a nivel de secuencia nucleotídica de viroides y su relación con la severidad de los síntomas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Virología Vegetal del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM-CCT-La Plata-CONICET), del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP, siendo algunos ensayos realizados en los invernáculos del CUIS de INTA EEA Concordia y su Laboratorio de Biotecnología.

II.1. MATERIALES

II.1.1. Reactivos químicos

Durante el desarrollo de esta tesis se usaron reactivos de grado analítico de marcas como Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (St. Louis, Estados Unidos), Anedra (Buenos Aires, Argentina), Bio Basic Inc. Toronto, Canadá/Amherst, Estados Unidos), Molecular Research Center, Inc. (Cincinnati, Estados Unidos), Promega (Madison, Estados Unidos), Genbiotech (Buenos Aires, Argentina), PanReac AppliChem ITW Reagents (Barcelona, España/Darmstadt, Alemania/ Milán, Italia) y Productos Bio-Lógicos (Buenos Aires, Argentina). Las enzimas y reactivos para las PCR fueron de grado Biología Molecular de Promega (Madison, Estados Unidos), Genbiotech (Buenos Aires, Argentina) y Biorad (Hercules, Estados Unidos).

II.1.2. Plantas de Cidra Etrog

Como planta indicadora y amplificadora de viroides, se utilizaron plantines de Cidra Etrog (*Citrus medica* L.) de la selección Arizona 861-S-1 injertados sobre limón rugoso (*Citrus × jambhiri* Lush.). Las mismas se inocularon por injerto con corteza de plantas recolectadas a campo o mediante cortes con navaja humedecida en los extractos de ARN y/o viroides. Las plantas se mantuvieron en invernáculo bajo condiciones controladas con una temperatura entre 28-32°C.

II.1.3. Plantas de tomate

Para los ensayos donde se buscó evaluar la severidad de los distintos aislamientos de CEVd, se utilizaron plantas de tomate (*Solanum lycopersicon*) Platense. Las semillas de tomates se mantuvieron en heladera a 4°C para favorecer la homogeneidad al momento de la germinación (Vanderwoude y Toole, 1980) y posteriormente se germinaron en bandejas de 200 alveolos con sustrato comercial GrowMix Multipro de Terrafertil. A la semana de germinadas las semillas, se trasplantaron los plantines a macetas de plástico soplado N° 10. Las plantas fueron inoculadas cuando emergen sus primeras hojas verdaderas, aproximadamente a la semana de trasplantadas. Las condiciones de germinación y crecimiento fueron de 28°C con fotoperiodo de 16 hs luz, 8 hs oscuridad. La intensidad de luz utilizada fue de 3500 lux.

II.1.4. Plantas de pepino

Para los ensayos donde se buscó evaluar la severidad de los distintos aislamientos de HSVd, se utilizaron plantas de pepino (*Cucumis sativus*) National Pickling. Al igual que las de tomates, se mantuvieron en heladera a 4°C. Las semillas fueron germinadas en bandejas de 200 alveolos con sustrato GrowMix Multipro de Terrafertil. Cuando las plántulas desplegaron completamente sus cotiledones, se trasplantaron a macetas de plástico soplado N° 12 para ser inoculadas al día siguiente. Las condiciones de germinación y crecimiento fueron de 28°C con fotoperiodo de 16 hs luz, 8 hs oscuridad. La intensidad de luz fue de 3500 lux.

II.1.5. Testigos de viroides

Se utilizaron aislamientos de la colección de agentes patógenos de cítricos de INTA Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Concordia (Entre Ríos, Argentina) (Tabla 2). Se cuenta con aislamientos locales, y otros cedidos por Karelía Velázquez del IVIA (España) y por Julia Figueroa y Florencia Palacios de la EEA Obispo Colombes (Tucumán, Argentina), todos mantenidos en plantines de cidra Etrog bajo condiciones de invernáculo, a 28-32°C. Los mismos fueron utilizados para las distintas etapas de esta tesis. A continuación, se detalla los mismos.

Código de la muestra	Planta hospedante	Viroides presentes	Procedencia
CEVd (EX5-8) P1	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CEVd	NEA Argentina
CEVd (EX5-8) P3	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CEVd	NEA Argentina
CEVd-HSVd-CDVd (EX9) P3	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CEVd-HSVd-CDVd	España
CEVd-HSVd-CDVd (EX9) P4	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CEVd-HSVd-CDVd	España
CVd I-III-IV (EX16) P2	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CDVd-CBLVd	España
CVd I-III-IV (EX16) P3	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CDVd-CBLVd	España
CEVd-HSVd (EX14) P1	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CEVd-HSVd	España
HSVd (T (+) 074) P1	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	HSVd	NOA Argentina
HSVd (T (+) 074) P2	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	HSVd	NOA Argentina
CVd-V (24/04/2015)	Cidra Etrog (<i>Citrus medica</i> L.)	CVd-V	España

Tabla 2: Colección de material de referencia mantenidos en invernáculo en cidra Etrog.

II.1.6. Muestras de viroides

Las muestras utilizadas fueron recolectadas de quintas de cítricos de la región citrícola del Río Uruguay que comprende el noreste de Entre Ríos y sur de Corrientes, específicamente los departamentos de Concordia y Federación en Entre Ríos, y Monte Caseros en Corrientes (Figura 13).



Figura 13: Mapa de los departamentos donde se tomaron las muestras.

II.1.7. Cebadores

Nombre	Secuencia de nucleótidos	Región amplificada (GenBank accession number)
CEVd-F4	5'-TCG GAA CCC TAG ATT GGG TCC CTC GGG-3'	Fragmento de 119b del genoma de CEVd (NC_001464.1)
CEVd-R1	5'-CCG GGG ATC CCT GAA GGA-3'	
CEVd-F1	5'-GGA AAC CTG GAG GAA GTC G-3'	Secuencia completa de CEVd (NC_001464.1)
CEVd-R1	5'-CCG GGG ATC CCT GAA GGA-3'	
HSVd-F1	5'-GGG GCA ACT CTT CTC AGA ATC C-3'	Secuencia completa de HSVd (NC_001351.1)
HSVd-R1	5'-GGG GCT CCT TTC TCA GGT AAG TC-3'	
HSVd-RT	5'-GTG TTG CCC CGG GGC TCC TTT CTC TGG-3'	
CBLVd-F1	5'-GGC TCG TCA GCT GCG GAG GT -3'	Secuencia completa de CBLVd (NC_001651.1)
CBLVd-R1	5'-TTC GTC GAC GAC GAC CAG TC-3'	
CDVd-F3	5'-CCG TGT GGT TCC TGT GGG GCA-3'	Fragmento de 86b del genoma de CDVd (NC_003264.1)
CDVd-R1	5'-TTC GTC GAC GAC GAC AGG TA-3'	
CDVd-F1	5'-GGC AGC TAA GTT GGT GAC GC-3'	Secuencia completa de CDVd (NC_003264.1)
CDVd-R1	5'-TTC GTC GAC GAC GAC AGG TA-3'	
CBCVd-F3	5'-GGT GGA TAC AAC TCT TGG G-3'	Fragmento de 135b del genoma de CBCVd (NC_003539.1)
CBCVd-R1	5'-GGG GAT CCC TCT TCA GGT-3'	
Ubiq1-F	5'-CAC CTC GTG CTT CGT CTC CG-3'	Fragmento de 193nt del gen de ubiquitina de citrus (GU362416.1)
Ubiq2-R	5'-GCG TCC TTC CAT CCT CCA GC-3'	
UbiqT-F	5'-CAT TTG GTG CTC CGT CTC CG-3'	Fragmento de 193nt del gen de ubiquitina de tomate (NM_001366381.1)
UbiqT-R	5'-GGG TGC GAC CAT CCT CGA GC-3'	
UbiqP-F	5'-CAC CTC GTG CTC CGG CTC CG-3'	Fragmento de 193nt del gen de ubiquitina de pepino (XM_031880415.1)
UbiqP-R	5'-GTG TTC GTC CAT CTT CCA AC-3'	
COX-F	5'-GTA TGC CAC GTC GCA TTC CAG A-3'	Fragmento de 68nt del gen citocromo oxidasa de citrus (CX297817.1)
COX-R	5'-GCC AAA ACT GCT AAG GGC ATT C-3'	

Tabla 3: lista de cebadores utilizados en el desarrollo de esta investigación.

II.2. MÉTODOS

II.2.1. Toma de muestras y desinfección de varetas

La toma de muestras de campo desde plantas cítricas con sintomatología característica de viroides, consistió en recolectar 12 varetas de cada árbol seleccionado, 3 por cada cuadrante del árbol o punto cardinal. Antes de proceder a la inoculación en cidra Etrog, las varetas se limpiaron con agua y detergente, se enjuagaron con abundante agua de canilla y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 30%, añadiendo 2-3 gotas de Tween, dejando actuar durante 20 minutos. Posteriormente, se enjuagaron tres veces con agua destilada, se secaron y se almacenaron en la heladera hasta su uso, envueltas en papel servilleta dentro de una bolsa.

II.2.2. Inoculación de muestras mediante injerto en cidra Etrog (*Citrus medica* L.)

Con las muestras recolectadas de campo se inocularon plantines de cidra Etrog (*Citrus medica* L.) de la selección Arizona 861-S-1 injertados sobre limón rugoso (*Citrus × jambhiri* Lush.). La inoculación se realizó mediante injerto en forma de T-invertida con un trozo de corteza proveniente de las varetas tomadas de las plantas de campo. A cada plantín se le injertaron 3 trozos de corteza y por cada muestra de campo se inocularon 4 plantines de cidra Etrog, utilizándose de esta forma las 12 varetas provenientes del campo. Los plantines se mantuvieron en invernáculo a 28-32°C.

Los plantines inoculados se conservaron en invernáculo durante todo el desarrollo de esta tesis, con un mínimo de 24 meses para el diagnóstico biológico mediante evaluación de la manifestación de síntomas, y, además, se utilizaron para la obtención de material vegetal para el sPAGE y la RT-qPCR.

II.2.3. Indexing biológico, observación de síntomas en cidra Etrog

En el ANEXO II se describen los principales síntomas que se observan en las plantas de cidra Etrog inoculadas con viroides y/o muestras que contienen viroides, y sus distintos grados de expresión. Para la clasificación de las plantas, se consideraron los síntomas, su intensidad y el grado de afección de la planta en su totalidad.

La observación de síntomas se hizo en 3 oportunidades; a los 5 meses desde la inoculación cuando se obtuvo material vegetal para el diagnóstico mediante sPAGE, al año de la inoculación y a los 2 años.

II.2.4. Extracción de ARN para Electroforesis Secuencial (sPAGE)

El protocolo utilizado fue el propuesto por Duran-Vila *et al.* 1988b con algunas modificaciones. Se utilizaron hojas jóvenes y tallos provenientes de las plantas de cidra Etrog. Se picó con bisturí 5 g de tejido y se homogeneizó en 5 mL de buffer de extracción (Tris-HCl 0.4 M, pH 8.9; SDS al 1%; EDTA 5 mM, pH 7.0; β-mercaptoetanol 4%) y 15 mL de fenol saturado en agua, pH 7.0. La molienda se realizó con un macerador Tissumizer Modelo TR-10 (Tekmar Company) a 11000 rpm

durante 1 minuto. Luego se procedió a pasos de centrifugado y diálisis para eliminar otros componentes celulares. Los ácidos nucleicos totales se fraccionaron en LiCl 2 M y la fracción soluble se concentró por precipitación con etanol y se resuspendió en 200 μ L de H₂O mQ (Duran-Vila *et al.*, 1988b). Para el sPAGE, se utilizaron alícuotas de 20 μ L. Previamente a la corrida, la concentración del ARN purificado se midió por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes como un control de calidad.

II.2.5. Análisis del ARN mediante sPAGE

Se utilizaron alícuotas de 20 μ L del ARN total extraído. El primer gel fue al 5% en buffer TAE en condiciones no desnaturalizantes. Como colorante de la corrida se utilizó azul Bromofenol/Xileno cianol. Se corrió a 60 mA a una temperatura de 4°C hasta que el colorante azul Bromofenol haya avanzado 7 cm. Se sacó el gel y se cortó una tira de 1.5 cm de ancho conteniendo la zona de viroides comprendida entre el CEVd y el ARN 7S, región donde migran todas las moléculas de ARN circulares en el rango de 246 a 371 nucleótidos y que coincide con la migración de Xileno cianol, la banda del colorante debe quedar comprendida en el fragmento de 1,5 cm de ancho. Este fragmento se colocó en la parte superior del segundo gel de poliacrilamida al 5% en condiciones desnaturalizantes, con urea 8 M en buffer TAE pH 6,5. Dicho gel se sometió a corriente constante de 20 mA durante 6 hs. a temperatura ambiente. Al finalizar, se tiñó el gel con nitrato de plata y se observó con transiluminador de luz blanca. Como controles para la corrida de sPAGE se utilizaron extracciones de testigos del banco de viroides del INTA-Concordia mencionados en los materiales.

II.2.6. Extracción de ARN para RT-qPCR

Para la extracción de ARN total a partir de muestras de corteza de los plantines de cidra Etrog se utilizó TRI Reagent (Molecular Research Center). Se partió de 100 mg de tejido en 0,5 ml de TRI Reagent. Se molió en homogeneizador (MP Biomedicals) durante 2 ciclos de 40'' a 4 m/s, y luego de centrifugar y recuperar el sobrenadante, se realizó una extracción con cloroformo para aumentar el nivel de pureza del ARN a extraer. Se precipitó el ARN con isopropanol y NaCl 1,2 M, y se realizó un lavado con etanol al 70%. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 30 μ l de H₂O mQ. Las extracciones se conservaron en freezer a -20°C.

La concentración del ARN purificado se midió por absorbancia a 260 nm utilizando un espectrofotómetro de microvolúmenes (Nano Drop One ND-ONE). Además, se llevó a cabo una evaluación adicional para garantizar la calidad y la integridad de las extracciones mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1X, utilizando GelRed como agente de tinción. En este control, se verificó la presencia de las bandas correspondientes al ARN ribosomal (ARNr) 18S y 28S, como indicadores de una extracción exitosa.

II.2.7. Digestión con ADNsa libre de ARNs

Para eliminar el posible ADN genómico contaminante en las muestras de ARN total se realizó un tratamiento con ADNsa. Se trataron aquellas muestras de ARN que luego deben ser analizadas por RT-qPCR, y así poder realizarle cuantificación relativa. Se digirieron 2 μ g de ARN con 1 U de

la enzima RQ1 ADNsa libre de ARNsa (Promega). Se utilizó el buffer suministrado por el fabricante en un volumen final de 10 μ L. Se incubó durante 30 min a 37°C, luego se agregó 1 μ L de la solución Stop también suministrada por el fabricante, y se incubó durante 10 min a 65°C para inactivar la enzima. Estas muestras fueron luego utilizadas para llevar a cabo la reacción de transcripción reversa y qPCR utilizando un kit en un solo paso.

II.2.8. Análisis del ARN mediante RT-qPCR

Para la RT-qPCR se utilizó la extracción de ARN realizada con TRI Reagent, mencionada en el apartado anterior. Para la amplificación se utilizaron los cebadores diseñados por Bernard *et al.* (2006) para los distintos viroides, detallados en la sección "I.i.7. Cebadores" de los Materiales (Tabla 3). La reacción de RT seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR) se llevó a cabo en 10 μ l utilizando el kit *iTaq Universal SYBR Green One-Step* (BIO-RAD), el par de cebadores y los nanogramos de ARN por reacción dependiendo del viroide a detectar. Las condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos fueron los indicados por el kit de BIO-RAD, ajustados para cada par de cebadores específico. En el ANEXO V se detallan las concentraciones y las condiciones de las reacciones de RT-qPCR para cada viroide y los controles internos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler realplex* (Eppendorf).

Para la normalización de los valores obtenidos, se utilizaron 2 genes de referencia. Se seleccionó el gen ubiquitina y el de citocromo oxidasa como controles internos, ya que se ha reportado que son genes estables y sus expresiones no se ven alteradas por las condiciones del experimento (De Francesco *et al.*, 2015; Osman *et al.*, 2015). Para ubiquitina se utilizó el par de cebadores Ubqt1-F/Ubqt2-R, diseñado sobre la secuencia del transcripto del gen ubiquitina GU362416.1 de *C. sinensis* (De Francesco *et al.*, 2015). El fragmento amplificado tiene un tamaño de 193 nucleótidos. Para la cuantificación relativa en tomate o pepino, se sintetizaron pares modificados para el mismo gen considerando los cambios de nucleótidos de cada especie.

La citocromo oxidasa (COX) es una enzima ubicua que contiene tres subunidades, todas codificadas en el genoma mitocondrial. El ARNm de la subunidad 1 (COX1) se ha utilizado como control interno para el análisis de expresión de genes en plantas mediante RT-qPCR. Los cebadores utilizados son COX-F/R basado en Li *et al.* (2006) donde el producto esperado es de 68 nucleótidos. Para la cuantificación relativa en tomate o pepino se utilizó el mismo juego de cebadores ya que variaba sólo una base.

La cuantificación relativa normalizada a los dos genes de referencia mencionados se realizó mediante el método *Pfaffl* utilizando los valores brutos de Ct obtenidos tanto para el viroide en cuestión como de los controles internos citocromo oxidasa (COX) y ubiquitina. Para dicho cálculo se utiliza la siguiente ecuación (1) (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

$$\text{Cuantificación relativa} = \frac{E_{\text{viroide}}^{-(Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{testigo positivo}})}}{E_{\text{controles internos}}^{-(Ct_{\text{muestra}} - Ct_{\text{testigo positivo}})}}$$

Ecuación 1: Cálculo de cuantificación relativa de viroides mediante los valores de Ct obtenidos por RT-qPCR.

Donde E son las eficiencias de amplificación tanto para el viroide como para los controles internos y los Ct son los valores obtenidos en la PCR en tiempo real tanto para el viroide como para sus controles internos, en las muestras evaluadas y en el testigo positivo de referencia utilizado para relativizar la cuantificación. El valor de eficiencia de amplificación para los controles internos es un promedio entre ambos valores de eficiencias de ambos controles internos.

Para estimar el de Ct utilizado para los controles internos en todas las muestras y testigo positivo de referencia, se calcula utilizando los valores de Ct de ambos controles internos, ubiquitina y COX, para todas las muestras mediante la utilización de la función media geométrica, que se detalla su cálculo en la ecuación 2:

$$\text{Media geométrica} = \sqrt[2]{Ct_{ubiquitina} \times Ct_{COX}}$$

Ecuación 2: Cálculo de la media geométrica entre valores de Ct de ambos controles internos.

II.2.9. Aislamiento de viroides desde gel de poliacrilamida

Para aislar los viroides en esta tesis, se utilizó el protocolo reportado por Serra *et al.*, 2008 con algunas modificaciones, el cual fue cedido por el Dr. José Antonio Darós Arnau del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP) de la Universidad Politécnica de Valencia. Se analizó el ARN por sPAGE como ya se describió, pero la tinción final del gel desnaturalizante será teñido con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas de los viroides con UV. Se cortaron los fragmentos del gel donde se encuentran las formas circulares de los viroides. Los mismos se recuperaron por elución durante toda la noche con buffer TEP (0.1 M Tris-HCl, pH 9.0, conteniendo 0.1 M de 2-mercaptoetanol, 10 mM EDTA, y 1% de SDS) en presencia de fenol/cloroformo. El ARN se precipitó con etanol y luego fue resuspendido en H₂O mQ (Serra *et al.*, 2008).

II.2.10. Bioensayos de transmisión de viroides y pruebas de severidad

II.2.10.1. Inoculación de plantines de cidra Etrog

Se inocularon 6 plantines de cidra Etrog (*Citrus medica* L.) de la selección Arizona 861-S-1 injertados sobre limón rugoso (*Citrus × jambhiri* Lush). Cada plantín se inoculó con la suspensión de CDVd recuperado que se detalló en el apartado anterior. A cada plantín se le realizó 4 cortes con navaja y en la misma herida se colocó 1 µl de suspensión. Los plantines fueron mantenidos en invernáculo 28–32 °C durante un mínimo de 3 meses hasta observar síntomas. Una vez transcurrido ese periodo, se procedió a realizar diagnóstico por RT-qPCR.

II.2.10.2. Inoculación de plantines de tomate

Se inocularon plantines de tomate (*Lycopersicon esculentum*) Platense inoculados según lo reportado por Duran-Vila *et al.* (1988b) para pepino, pero con algunas modificaciones. Para este ensayo se inocularon cuatro plantines de tomate Platense con 7 µl de extracto cada uno, proveniente del procedimiento de aislamiento de CEVd. Se colocaron 6 gotas de 1,1 µl de extracto sobre el hipocótilo del plantín, y luego se atravesó la gota con una aguja pinchando el tallo y

permitiendo que el extracto ingrese a la planta. La inoculación se realizó cuando las primeras hojas verdaderas estaban emergiendo. Las plantas fueron mantenidas en incubadora a 28-32°C con fotoperiodo de 16 hs luz, 8 hs oscuridad, con intensidad de luz de 3500 lux. Después de 3 semanas, se observaron las plantas en busca de síntomas, se registraron las alturas de los plantines y se recogió material para la extracción de ARN para el diagnóstico de CEVd mediante RT-qPCR.

II.2.10.3. Inoculación de plantines de pepino

Se inocularon plantines de pepino (*Cucumis sativus*) National Pickling según lo descrito en Duran-Vila *et al.*, 1988b, con algunas modificaciones. Se utilizaron 4 plantines por muestra, y cada uno fue inoculado con 7 µl de la recuperación de ARN desde sPAGE de HSVd. Se realizaron múltiples pinchazos a través de la gota de extracto sobre el hipocótilo cuando las primeras hojas verdaderas estaban emergiendo. Los plantines fueron mantenidos en incubadora a 28-32°C con fotoperiodo de 16 hs luz, 8 hs oscuridad, y la intensidad de luz de 3500 lux. Después de 3 semanas, se observaron las plantas en busca de síntomas y se le cortaron los ápices caulinares a cada planta. Los síntomas volvieron a ser observados a las 3 semanas posteriores, antes de recoger material de la segunda brotación de tejido apical para la extracción de ARN. Los plantines fueron diagnosticados para HSVd mediante RT-qPCR.

II.2.11. Secuenciación convencional

La secuenciación de los viroides se realizó en una primera instancia el clonado de los mismos. El primer paso fue realizar una RT-PCR con los cebadores reportados por Bernard *et al.* (2006), que amplifican las secuencias completas de los viroides.

II.2.11.1. Reacción de transcripción reversa (RT)

Las reacciones de RT se realizaron en 10 µL finales según las especificaciones del proveedor de la enzima. Se partió de 4 µl de la muestra a una concentración de 250 ng (1 µg de ARN total), se agregó el cebador reverso a una concentración final de 1 µM y 1,5 µL de agua mQ. Se incubó a 70°C durante 5 min y se enfrió rápidamente en agua-hielo por 2 min. Se agregaron 100 U de transcriptasa reversa M-MLV (PB-L, Productos Bio-Lógicos, Buenos Aires, Argentina), 1 µL de dNTPs (10 mM de cada uno) y 2 µL del buffer 5X de la enzima. Se incubó a 42°C por 60 min y luego a 70°C durante 15 min. El producto generado en la reacción de RT se utilizó posteriormente como molde en las reacciones de PCR.

II.2.11.2. Reacción de amplificación del ADN copia

La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl usando 4 µl de ADNc, 1 U Taq ADN polimerasa (PB-L), los cebadores F1/R1 detallados en la Tabla 3 según el viroide a amplificar (0.5 mM de cada cebador para CEVd y 0.3 mM para los cebadores de HSVd y CDVd) y dNTPs (0.10 mM de cada uno) en el buffer 1X provisto por la enzima y el MgCl₂ a 3 mM. Las condiciones del ciclado consistieron en un paso de desnaturalización por 5 min a 94°C, seguido de 40 ciclos (30'' a 94°C,

30'' a 55°C y 60'' a 72°C) para finalizar con un paso de extensión final por 5 min a 72°C. Los productos fueron analizados en un gel de agarosa al 1.5%.

II.2.11.3. Purificación de ADN a partir del producto de PCR

Los fragmentos de ADN fueron purificados utilizando el kit de purificación de productos de PCR/Gel AccuPrep® de Bioneer (Bioneer Inc., Alameda, California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo del fabricante. Como en la amplificación por PCR se obtuvo un único producto en cada reacción, la purificación se realizó desde el producto de PCR utilizando las soluciones provistas por el kit. Se partió de 20 µl de producto de PCR y se obtuvo 20 µl de ADN de interés purificado.

II.2.11.4. Clonado en pGEM®-T Easy Vector

Los fragmentos de ADN recuperados fueron clonados en el sistema pGEM®-T *Easy Vector Systems I* (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y transformados por electroporación en bacterias electro-competentes *Escherichia coli* DH5α. Las bacterias transformantes se incubaron en placas de LB/ampicilina a 37°C. Las colonias se seleccionaron al azar y se confirmó la presencia del inserto por colony PCR.

II.2.11.5. Colony PCR

La verificación de la inserción del fragmento de interés en el vector de clonado se realizó por PCR, con los cebadores específicos para cada viroide. Para ello, se utilizó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano crecido en medio sólido que se resuspendió en 10 µL de agua mQ y se incubó a 100°C durante 5 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, y se utilizó una alícuota de 1 µL del sobrenadante como molde en las reacciones de PCR utilizando las mismas condiciones del apartado "II.2.11.a. Reacción de amplificación del ADN copia" con los respectivos cebadores para cada viroide. Las colonias que resultaron positivas fueron replicadas en cultivo líquido de LB/ampicilina a 37°C overnight.

II.2.11.6. Minipreparación de ADN plasmídico

Para la purificación de ADN plasmídico se utilizó el protocolo de lisis alcalina. Se replicó cada clon en medio líquido LB (Luria Bertoni) /ampicilina/estreptomicina a 37°C overnight, y al día siguiente con el cultivo bien saturado se centrifugó a 6500 rpm durante 5 minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió en 200 µL de buffer GTE (25 mM Tris-HCl pH 8; 50 mM glucosa; 10 mM EDTA pH 8), se agregó 300 µL de solución de lisis (0,2 N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó en agua-hielo durante 5 minutos. Luego se agregó 300 µL de acetato de potasio 3 M pH 4,8 para neutralizar la solución, se incubó nuevamente en agua-hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 6500 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo de 2 ml donde se realizó tratamiento con ARNsa-A agregando 10 µl de solución de 10 mg/ml y se incubó durante 1 hora a 37°C. Pasado este tiempo, se agregaron 400 µl de cloroformo, se mezcló por inversión y se centrifugó 1 minuto a 15000 rpm. Se tomó la fase superior acuosa y se pasó a un tubo de 1.5 ml. Para precipitar el ADN se agregó 1 volumen de isopropanol 100% y se centrifugó 10 minutos a 15000 rpm. El *pellet* obtenido se lavó con 500 µl de etanol 70% y se resuspendió en 20 µL de agua mQ.

II.2.11.7. Verificación de calidad de las minipreps

La calidad de la miniprep se chequeó realizando un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio donde se cargó 1 µl de cada minipreps. De esta forma también se estimó la concentración de cada una para luego enviar a secuenciar mediante tecnología convencional.

II.2.12. Análisis de las secuencias

II.2.12.1. Procesamiento de las secuencias

Para el procesamiento de las secuencias se utilizó el programa ChromasPro Versión 2.1.10 y el Clustal Omega (Versión 1.2.4) (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). Con ambos programas se limpiaron y analizaron las secuencias reverse y forward de cada clon alineándolas entre sí y con la secuencia del vector de manera de reconstruir la secuencia del viroide.

II.2.12.2. Predicción de estructura secundaria de los viroides

Para la predicción de la estructura secundaria se utilizó el software *RNAstructure* Web Server versión 6.0.1 (<https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html>) seleccionando ARN como tipo de ácido nucleico y la temperatura a 20°C, con los demás parámetros por default.

II.2.12.3. Construcción de árboles filogenéticos

Para la elaboración de los árboles filogenéticos se utilizó el software MEGA versión 11.0.13 seleccionando las secuencias de interés, para crear los árboles. Este software permite realizar los alineamientos de las secuencias utilizando el programa ClustalW. Para estimar las distancias genéticas se empleó el método Neighbor-joining. El modelo de sustitución elegido fue el método Jukes y Cantor's. Las relaciones filogenéticas existentes entre los aislamientos, se analizó realizando el test de filogenia con el método Bootstrap, y como medida de soporte de las ramas, para establecer la estabilidad de los grupos formados; se realizó el análisis de bootstrapping con 10000 repeticiones.

Capítulo 1

Identificación de viroides presentes en la región citrícola del Río Uruguay

INTRODUCCIÓN

En la década de 1920 se describió la enfermedad del tubérculo fusiforme de la papa, pero no fue hasta la década de 1970 que se asoció al viroide PSTVd como agente causal de dicha enfermedad (Hammond, 2017). Este hecho marcó el comienzo de los estudios de estos novedosos agentes a nivel mundial, pero son pocos los trabajos realizados en Argentina sobre estos patógenos. Una de las dificultades es la amplia distribución de los viroides en diferentes cultivos, complejizando su caracterización.

En relación a viroides de plantas cítricas, en Argentina, se ha reportado la presencia de CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd en el noroeste del país (Palacios *et al.*, 2019), y en la zona citrícola del Río Uruguay se ha reportado la presencia de CEVd, HSVd y CDVd (Plata *et al.*, 2002). Esta última información fue resultado de un estudio de alcance limitado, por lo que no se puede asegurar que no se encuentren presentes otros viroides.

Dado el escaso conocimiento sobre los viroides presentes en la región citrícola del Río Uruguay, se propuso realizar un muestreo en la región para identificar qué viroides están presentes.

1.A. Selección de áreas representativas de la región citrícola del Río Uruguay y recolección de muestras de plantas cuya sintomatología sugiera la presencia de viroides.

La región citrícola del Río Uruguay está conformada principalmente por los departamentos de Concordia y Federación en la provincia de Entre Ríos, y por el departamento de Monte Caseros en la provincia de Corrientes. Para la toma de muestras se decidió dividir la región en 3 partes, de manera de coincidir con la división territorial de ambas provincias (Figura 14).

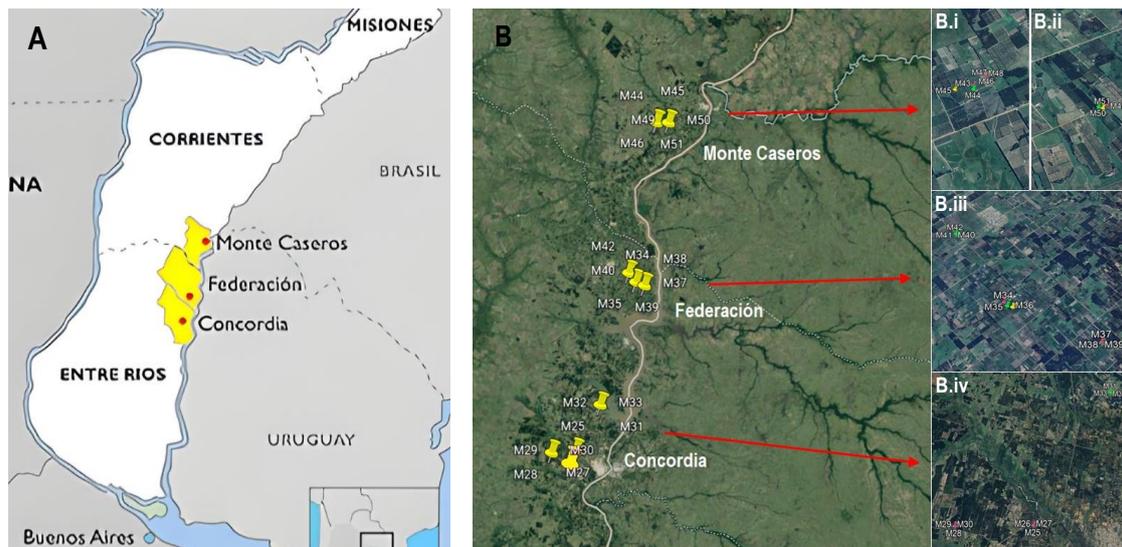


Figura 14: A) Distribución de la región citrícola del Río Uruguay. En amarillo se resaltan los Departamentos de Concordia, Federación y Monte Caseros. B) Se indica la ubicación de las plantas muestreadas en cada departamento. Las imágenes de la derecha (B.i, B.ii, B.iii y B.iv) muestran ampliaciones de las ubicaciones de las muestras en cada departamento: B.i) Muestras M43 a M48 del departamento de Monte Caseros (izquierda); B.ii) Muestras M49 a M51 del departamento de Monte Caseros (derecha); B.iii: Ampliación de las muestras del departamento de Federación; B.iv) Ampliación de las muestras del departamento de Concordia.

En cada área se visitó un mínimo de 3 quintas cuyas plantas proceden de material no certificado, y se tomaron 3 muestras de cada lugar. En la Tabla 4 se detallan las quintas y sus respectivos lotes donde se tomaron muestras, y a que área corresponde. En general, cada área muestreada requirió una jornada completa de trabajo, y las muestras recolectadas en cada salida fueron conservadas en conservadora mientras se permanecía en campo, y una vez en el laboratorio las mismas se conservaron envueltas en papel dentro de una bolsa en heladera a 4°C. En la sección “Toma de muestras y desinfección de varetas” de materiales y métodos se detalla el tratamiento que se le realizó previamente a la inoculación en cidra Etrog.

Área	Quinta – Lote
Departamento Concordia	INTA EEA Concordia – Lote 27
	Baggio – Lote 28
	De Eloi Goyan – Lote naranja Salustiana
Departamento Federación	De Fracalosi SA – Lote Dalzotto
	De Fabrello – Lote naranja Valencia late
	De Miguel Grigolato – Lote naranja Salustiana
Departamento Monte Caseros	De Eduardo Berta – Lote naranja Valencia late 1
	De Jorge Brambilla – Lote naranja Valencia late
	De Eduardo Berta – Lote naranja Valencia late 2

Tabla 4: Quintas y lotes muestreados de cada departamento.

Se recolectaron 3 muestras de cada sitio desde árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis*) que mostraron sintomatología de descortezado/acanaladuras sobre el pie y enanismo. Todos los árboles muestreados estaban injertados sobre trifolío (*Poncirus trifoliata*). En caso de encontrar árboles con diferentes grados de severidad en la sintomatología, se procedió a tomar muestras de cada uno de ellos. También se tomó una muestra de un árbol que no presentaba síntomas para cada una de las quintas visitadas. Se recolectaron 27 muestras en total. En la Tabla 5 se detalla la ubicación de cada muestra y los síntomas observados en la planta a campo. En el ANEXO I se muestran fotos de las plantas muestreadas al momento de la toma de muestra.

Muestras	Ubicación Fila/Planta - Variedad - Quinta	Sintomatología
M25	F7/P3 - Valencia Late - INTA EEA Concordia	Copa y pie sin síntomas
M26	F3/P1 - Valencia Late - INTA EEA Concordia	E-, P+, H+, Gp+++
M27	F7/P5 - Valencia Late - INTA EEA Concordia	E-, P+, Gp+
M28	F7/P10 - Valencia Seedless – Quinta Baggio	Copa y pie sin síntomas
M29	F14/P17 - Valencia Seedless – Quinta Baggio	E++, P+++, H++, Gp+++
M30	F16/P14 - Valencia Seedless – Quinta Baggio	E++, P++, H++, Gp+++
M31	F4/P11 - Salustiana – Quinta Goya	Copa y pie sin síntomas
M32	F2/P1 - Salustiana – Quinta Goya	E++, D+++, Gp+
M33	F4/P32 - Salustiana – Quinta Goya	E++, D+++, H++, Gp+++
M34	F5/P1 - Valencia Late – Quinta Fracalosi SA.	Copa y pie sin síntomas
M35	F3/P29 - Valencia Late – Quinta Fracalosi SA.	E+, P++, H++, Gp++
M36	F21/P57 - Valencia Late – Quinta Fracalosi SA.	E+, P+++, H++, Gp++
M37	F7/P3 - Valencia Late – Quinta Fabrello	Copa y pie sin síntomas
M38	F3/P12 - Valencia Late – Quinta Fabrello	E+/-, P+ sólo en un lateral no en toda la periferia del pie, H+, Gp+
M39	F1/P5 - Valencia Late – Quinta Fabrello	E-, P+/- sólo en un lateral no en toda la periferia del pie, H+, Gp+
M40	F8/P2 - Salustiana – Quinta Grigolato	Copa y pie sin síntomas
M41	F5/P8 - Salustiana – Quinta Grigolato	E++, D++, Gp+
M42	F9/P9 - Salustiana – Quinta Grigolato	E+, D+++, Gp+/-
M43	F2/P25 - Valencia Late – Quinta Berta	Copa y pie sin síntomas
M44	F6/P12 - Valencia Late – Quinta Berta	E+++, D+++, Gp++, H+
M45	F45/Ps/n - Valencia Late – Quinta Berta	E++++, D++, Gp+++, H++
M46	F1/P27 - Valencia Late – Quinta Brambilla	Copa y pie sin síntomas
M47	F1/P12 - Valencia Late – Quinta Brambilla	E+, D+++, Gp+++, H++, planta con menos follaje
M48	F3/P29 - Valencia Late – Quinta Brambilla	E++, D++, H+, Gp+++, planta con menos follaje
M49	F6/P50 - Valencia Late – Quinta Berta	Copa y pie sin síntomas
M50	F2/P11 - Valencia Late – Quinta Berta	E+/-, D++, H+++, Gp+++, planta con menos follaje y amarillenta
M51	F9/P23 - Valencia Late – Quinta Berta	E+, D+++, H+++, Gp+++, planta con menos follaje y amarillenta

Tabla 5: Muestras colectadas y descripción de la sintomatología observada en plantas de campo al momento de recolectar la muestra. Los números asignados a las muestras son correlativos a partir del 25 debido a que previamente se había recolectado muestras, pero no fueron incluidas en esta tesis. Todas las muestras son desde naranjo dulce (*Citrus sinensis*).

E: enanismo; D: descortezado del pie; P: protuberancias en el pie; Gp: acumulación de goma debajo de la corteza del pie; H: presencia de huecos debajo de la corteza en el pie.

Clasificación de los síntomas: sin síntoma: -, muy leve: +/-, leve: +, moderado: ++, severo: +++, muy severo: ++++

De cada planta se tomaron 12 varetas (tres por cada punto cardinal de la planta), las cuales se utilizaron para obtener un fragmento de corteza para inocular por injerto la planta indicadora, cidra Etrog (*Citrus medica* L.), de la selección Arizona 861-S-1 (Figura 15) injertados sobre limón rugoso (*Citrus x jambhiri* Lush). Se utilizaron 4 plantines por cada muestra de campo, y cada uno de ellos

fue inoculado con 3 fragmentos de corteza proveniente de las 12 varetas como se ilustra en la Figura 16.



Figura 15: Injerto de fragmentos de corteza de las muestras de campo sobre cidra Etrog (*Citrus medica* L.) de la selección Arizona 861-S-1.

Los plantines fueron mantenidos en invernáculo a 28-32°C para que naturalmente los viroides se amplifiquen y proceder a realizar los diagnósticos mediante *indexing* biológico y demás metodologías de diagnóstico.

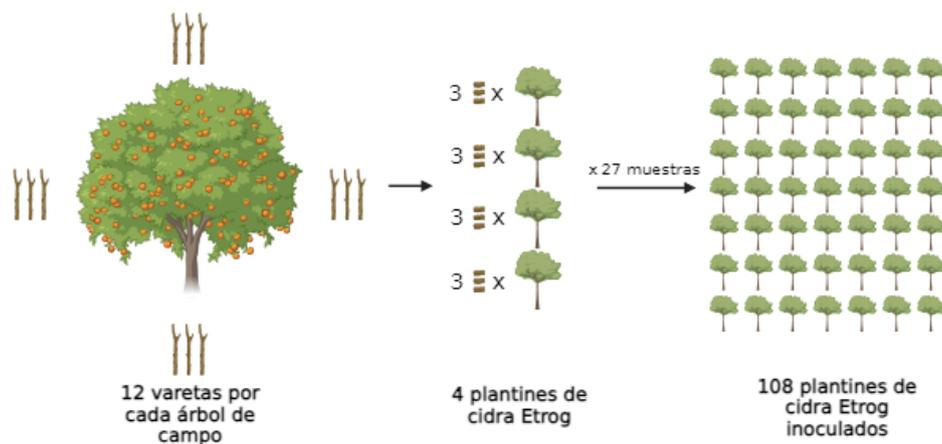


Figura 16: Esquema del muestreo realizado. Las 12 varetas tomadas por cada planta de campo se inoculan por injerto en 4 plantines de cidra Etrog. Creado con BioRender.

1.B. Identificación de viroides.

Las metodologías elegidas para identificación de los viroides de las muestras colectadas de campo fueron *indexing* biológico, electroforesis secuencial (sPAGE) y RT-qPCR.

Indexing biológico

El método biológico o *Indexing* se basa en la utilización de plantas indicadoras susceptibles, que acumulan al agente patógeno en altas concentraciones, provocando la expresión de síntomas característicos que indican su presencia (Lee *et al.*, 2021; Umaña Castro, 2010). El método no permite diferenciar viroides entre sí, sólo definir si están o no presentes (Umaña Castro, 2010). El hospedante más utilizado es cidra Etrog de la selección Arizona 861-S-1 injertado sobre limón rugoso y los síntomas observados, principalmente, son amarronamiento de peciolo y nervaduras, epinastia, retraso del crecimiento y acumulación de goma debajo de la corteza (ver ANEXO II). La inoculación se realizó injertando tres fragmentos de corteza por plantín que provienen de la planta a evaluar, requiriendo en total cuatro plantines por muestra (Figura 16). Luego se los incubó en invernáculo a 28-32°C. Además, se utilizaron ocho plantines como control positivo (cuatro inoculados con material de la planta testigo CEVd (EX 5-8) y cuatro con la planta testigo HSVd (T (+) 074)), y cuatro como control negativo sin inoculación con el fin de verificar las condiciones ambientales del invernadero durante el desarrollo del ensayo (Roistacher, 1991).

Durante el *indexing* biológico de viroides, las plantas fueron observadas en tres tiempos distintos desde la inoculación: a los 5 meses, al año y a los 2 años. Se evaluaron a distintos tiempos para un mejor seguimiento del desarrollo de los síntomas. Hay que remarcar que estas plantas también se utilizaron para los diagnósticos mediante sPAGE y RT-qPCR. En el caso de la RT-qPCR, se decidió utilizar las plantas de cidra Etrog en lugar de las de campo para asegurar la detección, ya que los viroides presentes se acumulan más en este hospedante. Los resultados detallados aquí corresponden a la observación realizada al año desde la inoculación, el cual fue considerado un tiempo adecuado para la correcta expresión y observación de síntomas. A ese tiempo además aún no se habían registrado bajas en el número de plantines debidas al deterioro provocado por la infección. En la Tabla 6 se detallan los síntomas observados y la severidad promedio entre los cuatro plantines.

Muestra	Síntomas					
	Epinastia*	Amarronamiento de peciolos	Amarronamiento en nervadura central	Amarronamiento en nervadura secundaria	Acumulación de goma debajo de la corteza	Retraso de crecimiento
M25	-	-	-	-	-	-
M26	+	++	+	+	+	+
M27	++	++	+	-	+/++	+
M28	+	++	+	-	++	+
M29	+	++	-	-	+	-
M30	+	++	+	-	+	-
M31	+/++	++/+++	+	-	+	+
M32	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M33	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M34	-	-	-	-	-	-
M35	+	+/++	+	+	+	+
M36	+++	++	+++	++	+++	+++
M37	-	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-	-
M39	+/++	++	+	-	+/++	+
M40	-	-	-	-	-	-
M41	+++	+	+	+	++	++
M42	+++	+	+	+	++	++
M43	-	-	-	-	-	-
M44	+++	++	++	++	++	+++
M45	++	++	++	++	++	+++
M46	-	-	-	-	-	-
M47	+++	++	++	++	++	+++
M48	+++	++	+	++	++	++
M49	+	+/++	-	-	+	-
M50	+	+/++	-	-	++	+
M51	+++	++	+	++	++	++

Tabla 6: Sintomatología observada en cidra Etrog al año de haberse inoculado los plantines con las muestras tomadas de campo. Clasificación de los síntomas: sin síntoma: -, leve: +, moderado: ++, severo: +++. Las filas en amarillo corresponden a muestras que no mostraban sintomatología a campo y resultaron positivas.

Los síntomas detallados en la tabla son un promedio de lo observado en los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo luego de un año bajo condiciones controladas de temperatura (28- 32°C).

*La epinastia es un síntoma de plantas en el que las hojas experimentan un aumento o disminución en el crecimiento de una de las caras, provocando la curvatura hacia abajo (Roistacher, 1991).

En el ANEXO III se pueden ver fotos de los plantines en los distintos tiempos, a los 5 meses, al año y a los 2 años desde la fecha de inoculación. Además, se detalla la sintomatología observada en los plantines correspondientes a cada muestra en los tras tiempos: a los 5 meses, al año y a los 2 años desde la inoculación (Tabla 29, 30 y 31 del ANEXO III).

En general se observó una buena correlación entre la severidad de los síntomas en las plantas a campo con la observada en las plantas indicadoras, aunque no para el 100% de las muestras. Algunos ejemplos de esta correlación son las muestras M32, M33 y M44 que mostraron enanismo y descortezado severo en campo, y en cidra se vieron síntomas bien marcados con categoría moderada/severa para M44 y severa en todos los síntomas para M32 y M33 al año de inoculación. Lo mismo para M47 y M48 que mostraron síntomas similares en intensidad tanto en campo como en cidra. En el caso de las plantas M27 y M35 se observaron en campo síntomas leves mayormente y luego en cidra los síntomas promediaron entre leves y moderados.

Las muestras sin sintomatología observable a campo, no presentaron viroides en su mayoría, salvo tres excepciones que fueron sintomáticas en cidra Etrog (Tabla 6). En total, se tomaron nueve muestras en campo de plantas sin síntomas, pero sólo seis resultaron negativas según el *indexing* biológico. Por otro lado, la muestra 38 mostró síntomas leves en campo, pero todos los

diagnósticos dieron negativos para la presencia de viroides. En la Tabla 7 se resume brevemente la correlación entre sintomatología a campo y en el experimento de *indexing* en cidra Etrog.

Muestra	Síntoma en naranjo a campo	Síntoma en cidra Etrog*
M25	Copa y pie sin síntomas	-
M26	P+, H+, Gp+++	Ep+, Ap++, Anc+, Ans+, G+ y Rc+
M27	P+, Gp+	Ep++, Ap++, Anc+, G+/+++ y Rc+
M28	Copa y pie sin síntomas	Ep+, Ap++, Anc+, G++ y Rc+
M29	E++, P+++, H++, Gp+++	Ep+, Ap++ y G+
M30	E++, P++, H++, Gp+++	Ep+, Ap++, Anc+ y G+
M31	Copa y pie sin síntomas	Ep+/+, Ap+/+++, Anc+, G+ y Rc+
M32	E++, D+++, Gp+	Ep+++, Ap++++, Anc++++, Ans++++, G+++ y Rc+++
M33	E++, D+++, H++, Gp++	Ep++++, Ap++++, Anc++++, Ans++++, G++++ y Rc++++
M34	Copa y pie sin síntomas	-
M35	E+, P++, H++, Gp++	Ep+, Ap+/+, Anc+, Ans+, G+ y Rc+
M36	E+, P+++, H++, Gp++	Ep++++, Ap++, Anc++++, Ans++, G+++ y Rc+++
M37	Copa y pie sin síntomas	-
M38	E+/-, P+ sólo en un lateral no en toda la periferia del pie, H+, Gp+	-
M39	P+/- sólo en un lateral no en toda la periferia del pie, H+, Gp+	Ep+/+, Ap++, Anc+, G+/++ y Rc+
M40	Copa y pie sin síntomas	-
M41	E++, D++, Gp+	Ep++++, Ap+, Anc+, Ans+, G++ y Rc++
M42	E+, D+++, Gp+/-	Ep++++, Ap+, Anc+, Ans+, G++ y Rc++
M43	Copa y pie sin síntomas	-
M44	E++++, D++++, Gp++, H+	Ep++++, Ap++, Anc++, Ans++, G++ y Rc+++
M45	E+++++, D++, Gp++++, H+++	Ep++, Ap++, Anc++++, Ans++++, G+++ y Rc++++
M46	Copa y pie sin síntomas	-
M47	E+, D++++, Gp++++, H++, planta con menos follaje	Ep++++, Ap++, Anc++, Ans++, G++ y Rc+++
M48	E++, D++, H+, Gp++++, planta con menos follaje	Ep++++, Ap++, Anc+, Ans++, G++ y Rc++
M49	Copa y pie sin síntomas	Ep+, Ap+/++ y G+
M50	E+/-, D++, H++++, Gp++++, planta con menos follaje y amarillenta	Ep+, Ap+/+, G++ y Rc+
M51	E+, D++++, H++++, Gp++++, planta con menos follaje y amarillenta	Ep++++, Ap++, Anc+, Ans++, G++ y Rc++

Tabla 7: Sintomatología comparada entre plantas de campo al momento de recolectar la muestra, y plantines de cidra Etrog al año de la inoculación.

Síntomas: E: enanismo; D: descortezado del pie; P: protuberancias en el pie; Gp: acumulación de goma debajo de la corteza del pie; H: presencia de huecos debajo de la corteza en el pie; Ep: epinastia; Ap: amarronamiento de peciolo; Anc: amarronamiento en nervadura central; Ans: amarronamiento en nervadura secundaria; G: acumulación de goma debajo de la corteza; Rc: retraso de crecimiento.

Clasificación de los síntomas en: sin síntoma: -; muy leve: +/-, leve: +, moderado: ++, severo: +++, muy severo: +++++. Las filas en verde corresponden a muestras que no mostraban sintomatología a campo y resultaron negativas por *indexing*.

*promedio de lo observado en los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo luego un año bajo condiciones controladas de temperatura (28- 32°C).

Esta metodología de diagnóstico nos permitió determinar si las muestras de campo eran positivas o negativas para la presencia de viroides, pero no permite especificar cuáles de ellos están presentes. Para la identificación individual de los viroides se requiere de metodologías moleculares como la sPAGE y la RT-qPCR. No se realizaron diagnósticos adicionales para otros tipos de patógenos, como virus, debido a que no se ha reportado sintomatología similar asociada a otro patógeno, ya sea en campo o en cidra Etrog. Atribuimos la sintomatología a los viroides presentes.

Electroforesis Secuencial (sPAGE)

Al cabo de 5 meses de incubación de los plantines de cidra Etrog a 28-32°C, se procedió a realizar la extracción de ARN para su análisis mediante sPAGE realizando un pool entre los cuatro plantines de cidra Etrog (Figura 17). Esta técnica implica realizar un gel en condiciones nativas seguido de uno en condiciones desnaturalizantes. El primer gel en condiciones nativas permite separar los viroides del resto de moléculas de ARN de la planta que no son de nuestro interés, y así enriquecer sólo en los pequeños ARNs. Bajo condiciones nativas, los viroides en su conformación circular y/o lineal, migran juntos. Finalizado el primer gel, se corta el fragmento de gel donde están los viroides, guiados por la tinción con xilencianol (xc) y se continúa con el segundo gel en condiciones desnaturalizantes que será teñido con plata. Este nos permite separar la conformación en forma de varilla de la circular del viroide ya que en condiciones desnaturalizantes la movilidad electroforética de esta última baja extraordinariamente. Debido a su gran poder de resolución para moléculas pequeñas y su alta sensibilidad por la tinción con plata, la sPAGE se utiliza mucho más que otras variantes de electroforesis para la detección de viroides. Los umbrales de detección dependen del sistema de gel y del método de visualización elegidos. Una ventaja de esta metodología es que no requiere la separación previa del ARN del ADN, ni de polisacáridos o polifenoles. Depende sólo de las propiedades termodinámicas de los viroides, su comportamiento electroforético y la sensibilidad a la tinción (Schumacher *et al.*, 1983; Hanold y Vadamalai, 2017; Steger y Riesner, 2018).

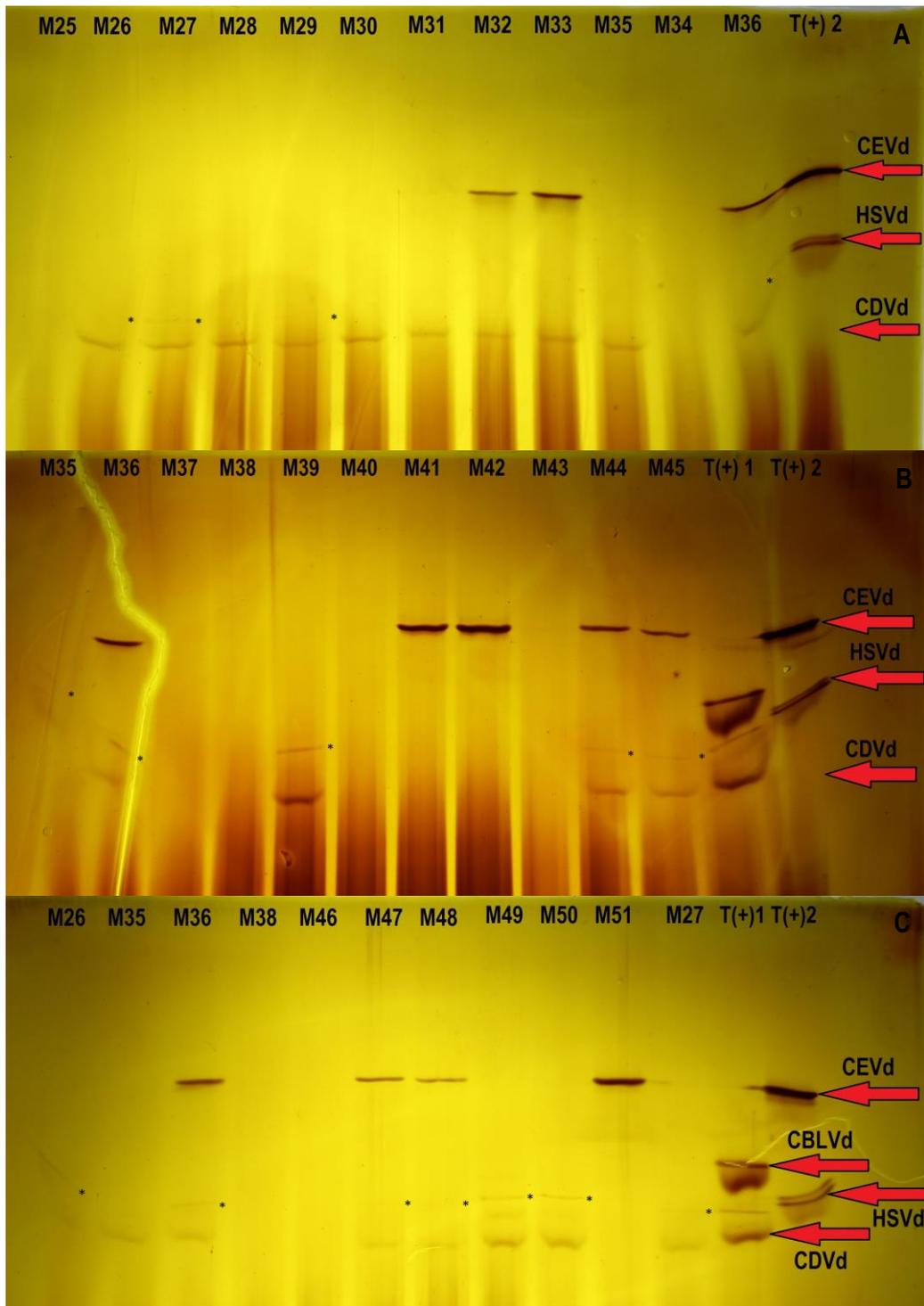


Figura 17: Detección de viroides en muestras provenientes de cidra Etrog mediante sPAGE. Se muestra el segundo gel (desnaturalizante). Se corrieron las muestras M25 - M26 - M27 - M28 - M29 - M30 - M31 - M32 - M33 - M35 - M34 - M36 respectivamente en A; M35-M36-M37-M38-M39-M40-M41-M42-M43-M44-M45 en B; y M26-M35-M36-M38-M46-M47-M48-M49-M50-M51-M27 en C. Los controles T(+1) corresponde a una mezcla de CBLVd y CDVd; y el T(+2) corresponde a una mezcla de CEVd y HSVd. Con flechas rojas se muestran las bandas para los diferentes viroides en los controles positivos. Se marcan con asteriscos (*) las bandas correspondientes a HSVd.

De la observación de las bandas características en los sPAGE de las 27 muestras de campo, incluyendo muestras de plantas sin síntomas, se pudo concluir que 20 muestras fueron positivas para al menos algún viroide, siendo 7 las que dieron negativas para todos los viroides. Este

resultado concuerda con el obtenido mediante el *indexing* biológico y, además, nos permitió identificar individualmente cada viroide por su tamaño en comparación con los controles positivos.

RT-qPCR

Los resultados de los sPAGE fueron confirmados mediante la metodología de RT-qPCR. La metodología sPAGE es menos sensible, y cuando el viroide está en baja concentración puede dificultar su visualización, principalmente para los viroides de menor tamaño. En el presente trabajo (Capítulo 5) se ajustó la metodología de RT-qPCR para cuatro viroides, tres de los cuales fueron los identificados en la región muestreada. Complementando ambas metodologías, 10 muestras resultaron positivas para CEVd, 17 para CDVd y 17 para HSVd. Estos resultados fueron coincidentes por ambos métodos (Tabla 8).

En la Figura 18 se muestran los resultados de las curvas de fluorescencia obtenidas mediante RT-qPCR para las muestras positivas de CEVd, HSVd y CDVd. Para CEVd, se presentan las curvas (Figura 18 A) y picos de *melting* (Figura 18 D) de las diez muestras que fueron positivas identificadas como M32, M33, M36, M41, M42, M44, M45, M47, M48 y M51. Además, se incluyen en el gráfico los controles positivos (T+), negativo (T-) y el control sin molde (*no template control*: NTC) como referencia. Para HSVd y CDVd, se presentan también las curvas (Figura 18 B y C, respectivamente) y picos de *melting* (Figura 18 E y F, respectivamente) para las 17 muestras que fueron positivas para ambos viroides, y se observó que las mismas coinciden ya que se los encontró siempre juntos. Dichas muestras fueron M26, M27, M28, M29, M30, M31, M32, M33, M35, M36, M39, M44, M45, M47, M48, M49 y M50. Además, se incluyen en el gráfico los controles positivos (T+), negativo (T-) y el control sin molde (NTC) como referencia. Cabe aclarar, que todas las plantas fueron evaluadas individualmente por RT-qPCR para CEVd, HSVd y CDVd, coincidiendo los resultados entre sPAGE y RT-qPCR para las muestras que dieron negativas.

Los análisis particulares de cuantificación de viroides por RT-qPCR se presentarán en los capítulos sucesivos (Capítulo 2: CEVd, Capítulo 3: HSVd y Capítulo 4: CDVd).

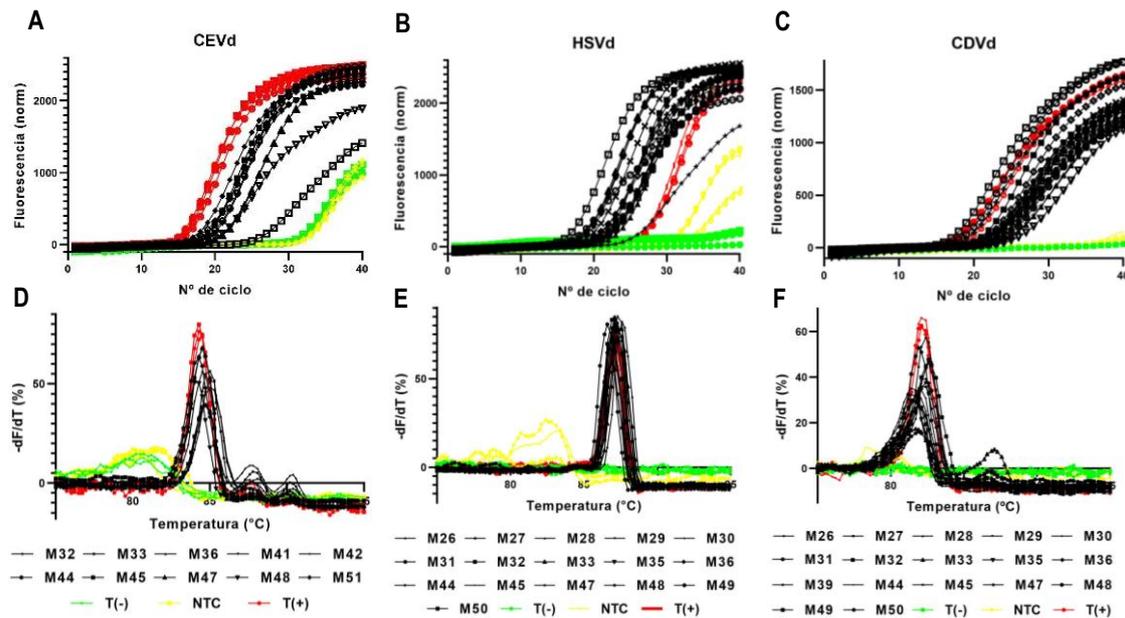


Figura 18: RT-qPCR de las plantas de cidra Etrog inoculadas con las muestras provenientes de campo. En la parte superior se muestran curvas obtenidas para todas las muestras que resultaron positivas para el viroide indicado A) CEVd, B) HSVd y C) CDVd; y en la parte inferior sus curvas de *melting* (D, E y F), respectivamente. Los puntos de cada curva son promedios de los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con la muestra de campo. Los gráficos A y D corresponden a los resultados de RT-qPCR para CEVd en las muestras M32-M33-M36-M41-M42-M44-M45-M47-M48-M51. Los gráficos B y E corresponden a los resultados de las RT-qPCR para HSVd en las muestras M26-M27-M28-M29-M30-M31-M32-M33-M35-M36-M44-M45-M47-M48-M49-M50. Los gráficos C y F corresponden a los resultados de las RT-qPCR para CDVd en las muestras M26-M27-M28-M29-M30-M31-M32-M33-M35-M36-M39-M44-M45-M47-M48-M49-M50. Los controles T (+) corresponden a plantas de cidra Etrog testigos positivos ya caracterizados en INTA EEA Concordia para CEVd, HSVd y CDVd respectivamente; mientras que el T (-) es una extracción desde una planta de cidra Etrog sin inocular. NTC: *no template control*. Las curvas del T(-) y NTC en los gráficos A y D, y el NTC en B y E, corresponden a la formación de dímeros de cebadores durante la corrida.

Los viroides CBLVd y CBCVd no fueron encontrados en las muestras por sPAGE ni por RT-qPCR. En la Figura 19 se pueden ver los resultados negativos de todas las muestras para las determinaciones de CBLVd (A y C) y CBCVd (B y D).

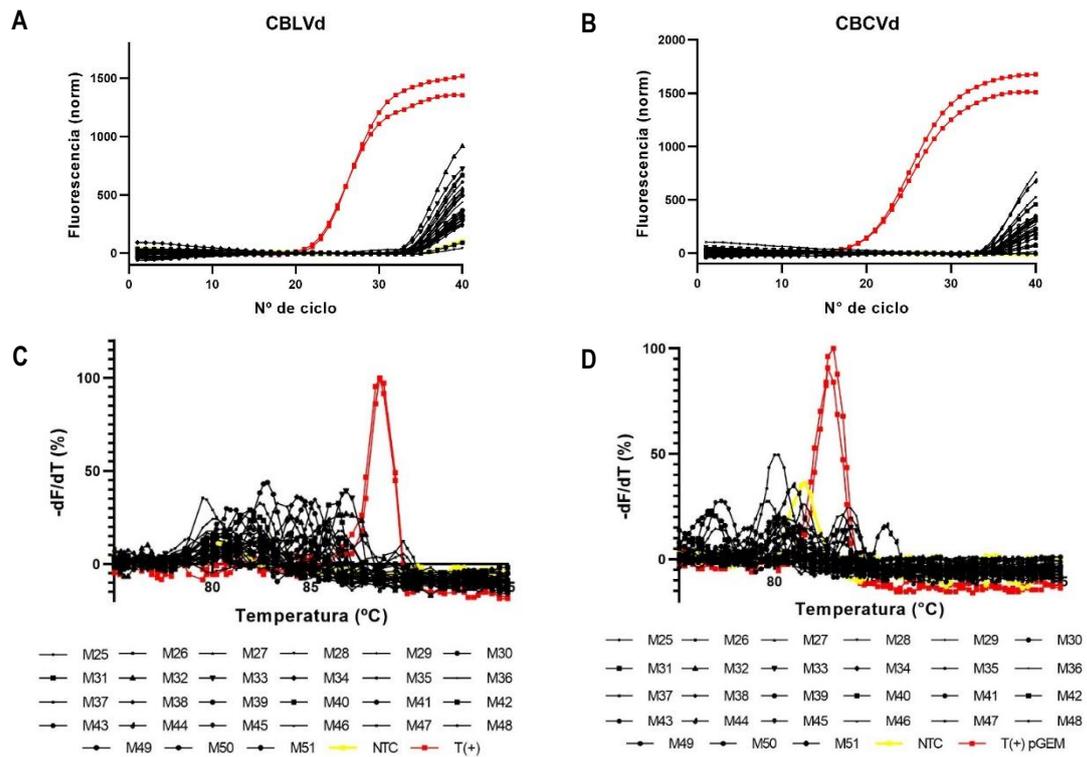


Figura 19: RT-qPCR para la detección de CBLVd (A y C) y CBCVd (B y D) en las plantas de cidra Etrog inoculadas con las muestras de campo. Para ambas RT-qPCR las muestras evaluadas fueron M25-M26-M27-M28-M29-M30-M31-M32-M33-M34-M35-M36-M37-M38-M39-M40-M41-M42-M43-M44-M45-M46-M47-M48-M49-M50-M51. Como control positivo (T+) para CBLVd se utilizó una planta de cidra Etrog testigo de INTA EEA Concordia inoculada con CBLVd. Como control positivo (T+) para CBCVd se utilizó el vector pGEM-T que tiene clonado el genoma completo de viroide. NTC: *no template control*.

En la Tabla 8 se resumen los resultados obtenidos que fueron coincidentes entre las metodologías SPAGE y RT-qPCR, detallando cada muestra y los viroides individuales que fueron hallados.

Muestra	CEVd	HSVd	CDVd	CBLVd	CBCVd
M25	-	-	-	-	-
M26	-	X	X	-	-
M27	-	X	X	-	-
M28	-	X	X	-	-
M29	-	X	X	-	-
M30	-	X	X	-	-
M31	-	X	X	-	-
M32	X	X	X	-	-
M33	X	X	X	-	-
M35	-	X	X	-	-
M34	-	-	-	-	-
M36	X	X	X	-	-
M37	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-
M39	-	X	X	-	-
M40	-	-	-	-	-
M41	X	-	-	-	-
M42	X	-	-	-	-
M43	-	-	-	-	-
M44	X	X	X	-	-
M45	X	X	X	-	-
M46	-	-	-	-	-
M47	X	X	X	-	-
M48	X	X	X	-	-
M49	-	X	X	-	-
M50	-	X	X	-	-
M51	X	-	-	-	-

Tabla 8: Viroides identificados mediante las metodologías de SPAGE y RT-q PCR en las plantas de cidra Etrog inoculadas con las muestras de campo. Los casilleros con "X" corresponden a muestras positivas, y los casilleros con "-" a negativas.

Con estos resultados se concluye que el porcentaje de aparición de viroides es del 74,07% (20/27), lo que significa que el 74% de las plantas analizadas (incluyendo las que no manifestaban síntomas a campo) estaban infectadas con al menos un viroide o una combinación de estos (CEVd, HSVd y CDVd) (Figura 20). El porcentaje de plantas infectadas del total de las que presentaban síntomas a campo fue del 94%, siendo muy buena la correlación entre sintomatología a campo y presencia de viroides. Dos plantas sin síntomas a campo dieron positivas por *indexing* y RT-qPCR. Esto no es algo inusual, ya que la manifestación de síntomas en campo depende no sólo del o los viroides presentes, sino que del momento de infección. Si la planta ya es adulta, es habitual no observar síntomas a campo ya que la planta ya se ha desarrollado. Otro factor que también afecta la expresión de síntomas a campo es el estado nutricional y fitosanitario del lote para otras enfermedades y plagas, ya que no es lo mismo en una planta infectada con mala nutrición y carente de manejo fitosanitario que expresará mucho más los síntomas.

Los viroides CBLVd y CBCVd no fueron detectados en las muestras tomadas.

Los porcentajes de aparición de cada viroide, considerando sólo las muestras que resultaron positivas son:

- CEVd: 10/20= 50%

- HSVd: 17/20= 85%
- CDVd: 17/20= 85%
- CBLVd: 0%
- CBCVd: 0%

Además, las frecuencias de combinaciones de viroides encontradas en plantaciones de cítricos en la zona citrícola del Río Uruguay son del 50% para HSVd-CDVd, del 35% para CEVd-HSVd-CDVd, y del 15% para CEVd (Figura 20).

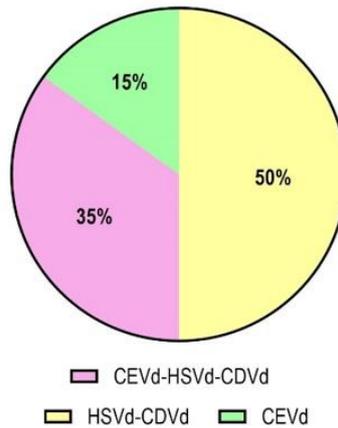


Figura 20: Porcentajes encontrados de las combinaciones de los tres viroides.

1.C. Aislamiento de los diferentes viroides encontrados para caracterizarlos biológica y molecularmente.

Se seleccionaron algunas muestras a partir de las plantas inoculadas de cidra Etrog para aislar viroides. Los criterios utilizados para dicha selección buscaron representar las diferentes áreas geográficas a la cual pertenecían y si los viroides se encontraban de forma individual o en mezclas con otros. Además, se tuvo en cuenta la severidad de la sintomatología que se observó en la planta de campo cuando se tomaron las muestras, y la expresada en cidra Etrog.

Si bien se pretendía aislar viroides a partir de un número mayor de muestras, la acumulación requerida para las corridas y recuperación a partir de sPAGE no siempre fue suficiente. Se utilizaron algunas de las muestras aisladas para la posterior inoculación de hospedantes alternativos y llevar a cabo la evaluación individual de cada viroide.

De la primera área de muestreo, que corresponde al departamento de Concordia (Entre Ríos), se eligió la **muestra 33** que posee los tres viroides CEVd-CDVd-HSVd. Tanto en la planta a campo como en cidra Etrog mostró síntomas severos (Figura 21 A, B, C y D).

De la segunda área, que corresponde al departamento de Federación (Entre Ríos), se eligió la **muestra 39** que contenía los viroides CDVd-HSVd. En este caso se incluyó una muestra que no contuviera CEVd, a fin de analizar el comportamiento de ambos sin la presencia de este último. Además, la planta a campo y las plantas de cidra Etrog inoculadas mostraban síntomas leves (Figura 21 E, F, G y H).

De la tercera y última área, que corresponde al departamento Monte Caseros (Corrientes), se eligió la **muestra 51** que contenía sólo CEVd. Esta muestra en campo mostró enanismo leve y síntomas severos de descortezado, impregnación de goma y huecos debajo de la corteza en el pie. En cidra también manifestó síntomas severos (Figura 21 I, J, K y L).

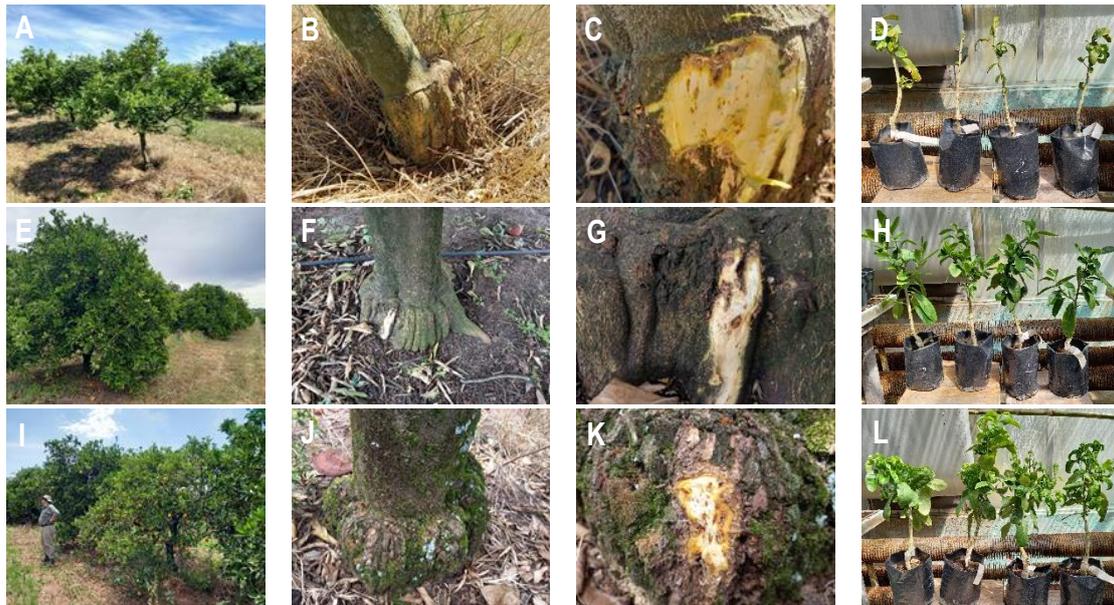


Figura 21: Plantas de campo de las que provenían las muestras para la inoculación de cidra Etrog utilizadas para el aislamiento de los viroides por sPAGE. Foto del árbol desde el cual se tomó la M33 (A), de su pie con descortezado severo (B), y de la acumulación moderada de goma y huecos debajo de la corteza (C). Sintomatología en los plantines de cidra Etrog (D) luego de un año inoculados con M33. Foto del árbol desde el cual se tomó la M39 (E), de su pie con protuberancias leves en la corteza (F), y de la acumulación leve de goma y huecos debajo de la corteza (G). Sintomatología en los plantines de cidra Etrog (H) luego de un año inoculados con M39. Foto del árbol desde el cual se tomó la M51 (I), de su pie con descortezado severo (J), y de la acumulación severa de goma y huecos debajo de la corteza (K). Sintomatología en los plantines de cidra Etrog (L) luego de un año inoculados con M51.

Luego de la selección de las muestras se procedió a realizar el aislamiento como se detalla en materiales y métodos. Se realizaron corridas electroforéticas secuenciales (sPAGE) y se cortó el fragmento del segundo gel conteniendo las bandas de los tamaños esperados para los distintos viroides, como se muestra en la Figura 22. Se corrieron 5 calles para cada muestra.

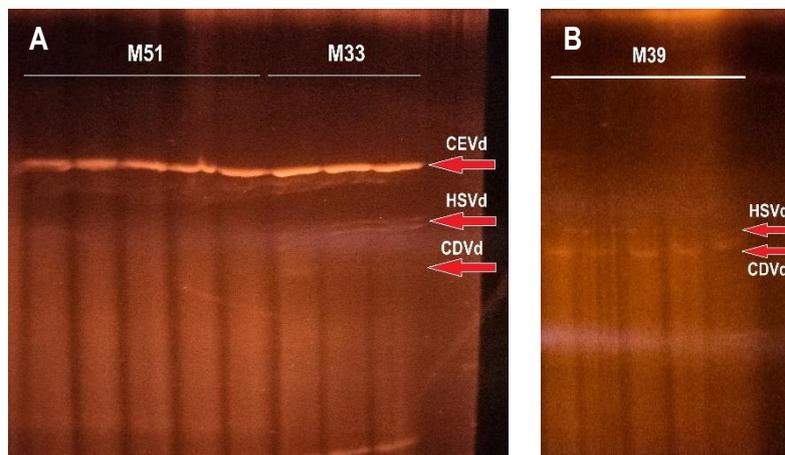


Figura 22: Aislamiento de viroides por electroforesis secuencial. Se muestra el gel desnaturalizante (segunda etapa de la metodología sPAGE) teñido con bromuro de etidio del cual se cortaron los fragmentos correspondientes a las conformaciones circulares de los viroides: CEVd de M51 (A); CEVd, HSVd y CDVd de M33 (A); y HSVd y CDVd de M39.

Para la muestra M33 fue posible aislar los tres viroides, CEVd, HSVd y CDVd. Las dobles bandas observadas en CEVd y HSVd corresponden a una alteración del campo eléctrico durante la corrida que provoca una variación en la migración de las moléculas de un mismo grupo, ya que en los sPAGE de la Figura 17 no se ve este perfil de doble banda. Si bien para HSVd y CDVd la visualización de las bandas fue muy tenue, no hubo inconvenientes para la recuperación de los

fragmentos. Para la M51 que contenía sólo CEVd también se visualizaron las bandas y se recuperó el fragmento. Por último, para la M39 también se visualizaron las bandas de HSVd y CDVd, permitiendo cortar las bandas para la posterior purificación de las conformaciones circulares de los viroides.

Las bandas correspondientes a las 5 calles por muestra fueron cortadas individualizando cada viroide y luego se procedió a realizar el protocolo de recuperación. Los extractos obtenidos fueron conservados a -20°C y posteriormente utilizados para la inoculación de hospedantes alternativos para la caracterización biológica de los aislamientos (Capítulos 2, 3 y 4).

DISCUSIÓN

Durante la realización del muestreo a campo se obtuvieron las muestras previstas, y se les realizó el diagnóstico biológico mediante inoculación en cidra Etrog, y la identificación por sPAGE y RT-qPCR, coincidiendo 100% los resultados. El diagnóstico de las muestras de campo mediante sPAGE requiere obligatoriamente la amplificación previa natural mediante la inoculación de cidra Etrog para aumentar los niveles de los viroides y así hacer posible su visualización. Dado que nuestra finalidad era identificar todos los viroides presentes, optamos por realizar la RT-qPCR a partir de las plantas de cidra Etrog, para garantizarnos que cada viroide estuviera en concentraciones que nos permitieran detectarlo mediante PCR sin complicaciones. Los viroides reportados mundialmente para cítricos actualmente son ocho, encontrándose presentes en la región citrícola del Río Uruguay sólo CEVd, HSVd y CDVd, y estando ausentes los viroides CBLVd y CBCVd. Si bien existen otros tres viroides como se mencionó, los mismos no fueron estudiados en este trabajo de tesis ya que son menos difundidos a nivel mundial, algunos de ellos aún restringidos a ciertas áreas o países (Tessitori, 2017; Najjar *et al.*, 2017; Chambers *et al.*, 2018) además de que no se evidenció la presencia de ellos mediante la metodología de sPAGE.

Estos resultados coinciden con el único reporte previo sobre viroides presentes en la zona del Río Uruguay (Plata *et al.*, 2002). En Argentina, también se ha reportado la detección de viroides de cítricos en el noroeste del país, habiéndose identificado CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd (Figuerola *et al.*, 2010; Palacios *et al.*, 2019). Además, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son coincidentes con los reportados por Pagliano *et al.* (2013), lo cual se fundamenta principalmente en la proximidad de la zona de interés con la región citrícola de la República Oriental del Uruguay.

Con los resultados obtenidos, concluimos que el porcentaje de aparición de viroides, bajo las condiciones de muestreo que detallamos, es del 74,07% (20/27), lo que significa que el 74% de las plantas analizadas (incluyendo las que no manifestaban síntomas a campo) estaban infectadas con al menos un viroide o una combinación de estos (CEVd, HSVd y CDVd). Este valor es cercano al reportado para el país fronterizo donde obtuvieron un porcentaje del 62% (Pagliano *et al.*, 2013).

El porcentaje de plantas infectadas del total de las que presentaban síntomas a campo fue del 94%, siendo muy buena la correlación entre sintomatología a campo y presencia de viroides. Esto no es muy frecuente ya que la manifestación de síntomas a campo no sólo depende del o los viroides presentes, sino del momento en que se inició la infección. Si la planta ya es adulta, es poco probable que manifieste síntomas a campo. Otro factor que también afecta la expresión de síntomas a campo es el estado nutricional y fitosanitario de la planta. Una planta infectada con mala nutrición y carente de manejo fitosanitario expresará muchos más síntomas que otras plantas con mejor manejo (Comunicación personal Ing. Agr. (M. Sc.) Claudio Gómez, INTA EEA Concordia).

Respecto a las combinaciones de viroides se observó que las frecuencias de mezclas encontradas en plantaciones de cítricos en la zona citrícola del Río Uruguay son del 50% para HSVd-CDVd, 35% para CEVd-HSVd-CDVd, y 15% para CEVd. En el reporte de Pagliano y colaboradores (2013)

se identificó la combinación HSVd-CDVd como la más difundida, seguida por CEVd-HSVd-CDVd, lo cual coincide con los hallazgos reportados en esta tesis.

Los porcentajes de aparición de cada viroide, considerando el total de muestras, son del 37,04% para CEVd y del 62,96% para HSVd y CDVd. Los tres viroides fueron mayoritariamente encontrados agrupados, manifestándose ya sea como una mezcla de HSVd y CDVd o en una infección triple con CEVd, HSVd y CDVd. La combinación HSVd-CDVd está ampliamente diseminada, siendo en algunos casos la de mayor porcentaje, seguida por CEVd-HSVd-CDVd (Pagliano *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros informes, la combinación más difundida fue la triple CEVd-HSVd-CDVd (Ito *et al.*, 2002; Najar *et al.*, 2017). Todos los reportes parecen coincidir en que los viroides CEVd, HSVd y CDVd son los más diseminados (Tessitori, 2017). A su vez, CEVd fue el único que se lo encontró en infección simple.

Con respecto a los distintos métodos de diagnóstico utilizados, se ha visto coincidencia entre las tres metodologías, ampliando la disponibilidad de técnicas en caso de requerir un diagnóstico complementario. En general se vio una buena correlación entre la severidad de los síntomas de las muestras a campo con la observada en la planta indicadora. Si bien la metodología *Indexing* biológico es un buen método, no permite discriminar entre viroides, presenta altos costos, requiere tiempo y espacio para mantener las plantas, es por esto que en algunos países ha sido desplazado. Sin embargo, no se puede prescindir del método ya que es de utilidad para complementar el análisis en ciertos casos no concluyentes.

Es importante destacar que se logró aislar algunos de los viroides identificados en las muestras de campo, lo que nos permitió continuar con los estudios de caracterización de estos patógenos en hospedantes alternativos (Capítulos 2, 3 y 4).

Capítulo 2

Citrus Exocortis viroid

INTRODUCCIÓN

Citrus Exocortis viroid (CEVd) fue el primer viroide de cítricos reportado por lo que es el viroide más conocido, y, además, causante de *Exocortis* en dicho cultivo (Duran-Vila, 2017). Tiene un tamaño de 370-375 nucleótidos con una estructura secundaria en forma de varilla, pertenece al género *Pospiviroid* con una amplia gama de hospedantes naturales y experimentales, dentro de los que se incluyen tanto especies sintomáticas como asintomáticas, incluyendo leñosas y herbáceas (Murcia, 2009; Serra, 2009; Wang *et al.*, 2019). Se han identificado infecciones, algunas asintomáticas, en cultivos como vid, berenjena, rábano blanco, zanahoria y haba. Además, se ha encontrado CEVd infectando naturalmente tomate, causando síntomas como proliferación apical, retraso en el crecimiento, epinastia, distorsión de las hojas y necrosis de las nervaduras (Murcia, 2009; Duran-Vila, 2019).

Esta distribución se alinea con el modelo de cuasi especie que caracteriza a cada aislamiento de viroide como una población heterogénea de variantes, contribuyendo a la adaptación a hospedantes específicos y asegurando su supervivencia (Duran-Vila, 2019).

Los hospedantes experimentales han sido de gran utilidad para poder estudiar mejor los aislamientos, diferenciar variantes y relacionar determinantes a nivel de secuencia con la expresión de síntomas. A nivel experimental los ensayos de infectividad y la caracterización biológica de este viroide se ha realizado en hospedantes herbáceos como *Gynura aurantiaca* (Weathers *et al.*, 1967; Chaffai *et al.*, 2007; Murcia *et al.*, 2011), crisantemo (*Dendranthema grandiflora*) (Visvader y Symons, 1983; Murcia *et al.*, 2011) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Visvader y Symons, 1983; Murcia *et al.*, 2011). Estos hospedantes desarrollan síntomas de enanismo acusado y/o retraso del crecimiento, epinastia y distorsión de las hojas (Murcia, 2019). Fue a partir de tomate específicamente que, en 1985, Visvader y Symons lograron clasificar variantes de CEVd en agresivas (Clase A) y leves (Clase B) correlacionándolas con secuencias específicas del genoma del viroide. La diferencia entre ambas variantes es de 26 nucleótidos que se ubican en las regiones patogénicas P_L y P_R, de los dominios P y V respectivamente. Utilizando *G. aurantiaca* se confirmó que efectivamente las variantes de CEVd que contenían las P_L y P_R característicos de la “Clase A” inducían síntomas severos mientras que las que contenían las P_L y P_R características de la “Clase B” inducían síntomas leves. Dichos resultados fueron confirmados por otros trabajos, como el de Chaffai *et al.*, 2007. Sin embargo, se han identificado otras variantes de CEVd en las que las secuencias de los motivos P_L y P_R no se ajustan a los definidos para la “Clase A” y la “Clase B” (Bernad *et al.*, 2005; Murcia, 2009).

Además de los reportes mencionados, Murcia y colaboradores (2011) informaron la existencia de una variante de CEVd que presenta una gran similitud a CEVd Clase A (96.5% de identidad) pero que no provoca síntomas en cidra Etrog, pero si lo hace en tomate. La variante A de CEVd provoca sintomatología tanto en cidra como en tomate. En dicho trabajo, se relacionó este comportamiento a dos cambios en la secuencia ubicados en el P_L, que al parecer modula la expresión de los síntomas. En cidra Etrog si vieron diferentes comportamientos en sintomatología para aislamientos con o sin cambios en la secuencia en P_L, pasando luego esto a tomate donde no pudieron ver diferencias, lo que los llevo a decir que la modulación de síntomas muchas veces está asociada o depende del hospedante en cuestión (Murcia *et al.*, 2011).

En el presente trabajo de tesis del total de muestras recolectadas y analizadas descritas en el capítulo 1, el 37.04% estaban infectadas por CEVd, ya sea en combinación con otros viroides o de manera individual. Considerando sólo las muestras que dieron positivas para CEVd, se lo encontró en un 70% de las plantas en infecciones mixtas con los viroides HSVd y CDVd, mientras que en un 30% infectando plantas de manera individual (Figura 23).

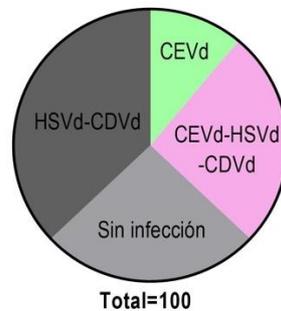


Figura 23: Porcentajes de aparición de CEVd en diferentes combinaciones en relación al total de plantas infectadas.

Las muestras de campo fueron inoculadas en cidra Etrog desde donde se realizaron los diagnósticos mediante *indexing* biológico, sPAGE (detallado en el Capítulo 1) y RT-qPCR coincidiendo 100% entre las técnicas.

2.A. Cuantificación de CEVd mediante RT-qPCR

A continuación, se resumen los valores de la cuantificación relativa obtenidos por RT-qPCR realizada a los plantines de cidra Etrog inoculados con las muestras de campo que resultaron positivos para CEVd (Figura 24). Dicha cuantificación se realizó utilizando una cuantificación relativa normalizada a dos genes de referencia mediante el método *Pfaffl* utilizando los valores brutos de Ct obtenidos tanto de viroide en cuestión con de los controles internos citocromo oxidasa (COX) y ubiquitina (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

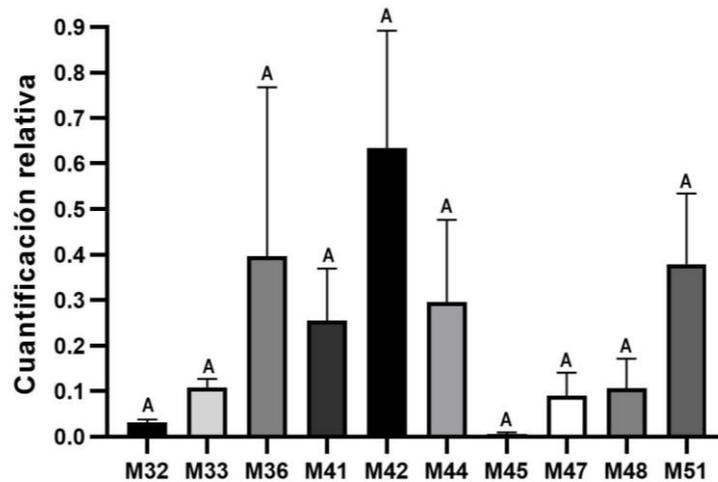


Figura 24: Cuantificación relativa mediante RT-qPCR de CEVd en plantines de cidra Etrog. Se presenta el promedio de los valores obtenidos para los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo que resultaron positivos para CEVd. Los datos se normalizaron utilizando dos controles internos: los genes de ubiquitina y citocromo oxidasa. Para la cuantificación relativa se utilizó el método *Pfaffl*. Sobre cada barra se representa el error estándar de la media (SEM). Se realizó un ANOVA, pero no se vieron diferencias significativas.

La dispersión de datos que se ve en la Figura 24 se debe a que se muestran los promedios de los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados por cada muestra, o sea que corresponde a la dispersión de diferentes réplicas biológicas.

No se pudo visualizar correlación entre los síntomas observados en campo y en cidra Etrog. En la Tabla 9 se resumen los datos correspondientes a la severidad de la sintomatología en campo y en las plantas indicadoras.

Muestras positivas para CEVd	Síntoma en naranjo a campo	Síntoma en cidra Etrog*
M32	E++, D+++, Gp+	Ep+++, Ap+++, Anc+++, Ans+++, G+++ y Rc+++
M33	E++, D+++, H++, Gp++	Ep+++, Ap+++, Anc+++, Ans+++, G+++ y Rc+++
M36	E+, P+++, H++, Gp++	Ep+++, Ap++, Anc+++, Ans++, G+++ y Rc+++
M41	E++, D++, Gp+	Ep+++, Ap+, Anc+, Ans+, G++ y Rc++
M42	E+, D+++, Gp+/-	Ep+++, Ap+, Anc+, Ans+, G++ y Rc++
M44	E+++, D+++, Gp++, H+	Ep+++, Ap+++, Anc+++, Ans++, G+++ y Rc+++
M45	E++++, D++, Gp+++, H++	Ep++, Ap++, Anc++, Ans++, G++ y Rc+++
M47	E+, D+++, Gp+++, H++, planta con menos follaje	Ep+++, Ap++, Anc++, Ans++, G+++ y Rc+++
M48	E++, D++, H+, Gp+++, planta con menos follaje	Ep+++, Ap++, Anc+, Ans++, G++ y Rc++
M51	E+, D+++, H+++, Gp+++, planta con menos follaje y amarillenta	Ep+++, Ap++, Anc+, Ans++, G+++ y Rc++

Tabla 9: Análisis de las muestras positivas para CEVd. Sintomatología en plantas de campo al momento de recolectar la muestra, en cidra Etrog al año de haberse inoculado los plantines indicadores, y acumulación de CEVd en plantas de cidra Etrog determinada por RT-qPCR.

Síntomas: E: enanismo; D: descortezado del pie; P: protuberancias en el pie; Gp: acumulación de goma debajo de la corteza del pie; H: presencia de huecos debajo de la corteza en el pie; Ep: epinastia; Ap: amarronamiento de peciolo; Anc: amarronamiento en nervadura central; Ans: amarronamiento en nervadura secundaria; G: acumulación de goma debajo de la corteza; Rc: retraso de crecimiento.

Clasificación de los síntomas: sin síntoma: -; muy leve: +/-, leve: +, moderado: ++, severo: +++, muy severo: ++++.

*promedio estimado de lo observado en los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo luego de cinco meses bajo condiciones controladas de temperatura (28- 32°C).

2.B. Caracterización molecular de aislamientos de CEVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.

Para la caracterización molecular, se seleccionaron cuatro muestras. Los criterios de selección fueron el área geográfica a la cual pertenecían, la severidad de la sintomatología que se observó en la planta de campo cuando se tomaron las muestras, y en las plantas de cidra Etrog al año de la inoculación. Las muestras elegidas fueron:

- M33 presenta síntomas extremadamente severos en cidras (al punto de que la viabilidad de las plantas a mediano plazo se encuentra comprometida), pertenece al área del Departamento Concordia, y se encuentra en combinación con HSVd y CDVd.
- M42 muestra síntomas moderados/severos tanto en campo como en cidra, pertenece al área del Departamento Federación, y es el único viroide detectado en la planta de campo.
- M45 con síntomas moderados en cidra y tendiendo a severos en campo, corresponde al área del Departamento Federación, y se encuentra en combinación con HSVd y CDVd.
- M51 los síntomas son mayormente moderados en cidra y tendiendo a severos en campo, pertenece al área del Departamento Monte Caseros, y se encuentra sólo en la planta.

La caracterización molecular de los aislamientos de CEVd se realizó mediante el clonado y la secuenciación de amplicones de las muestras mencionadas. Estos amplicones se obtuvieron desde extractos obtenidos a partir de las cidras Etrog inoculadas con las muestras de campo. Se secuenciaron un promedio de cinco clones por muestra, obteniendo la secuencia consenso completa del viroide para cada muestra mediante el uso del software online EMBOSS Cons del EMBL's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). En la Figura 25 se muestra el alineamiento entre las cuatro secuencias consenso de M33 (PP588715), M42 (PP588716), M45 (PP588717) y M51 (PP588718). Las secuencias entre clones no eran idénticas, pero los cambios en las secuencias individuales previas al consenso no afectan las regiones claves analizadas más adelante, y son cambios aislados.

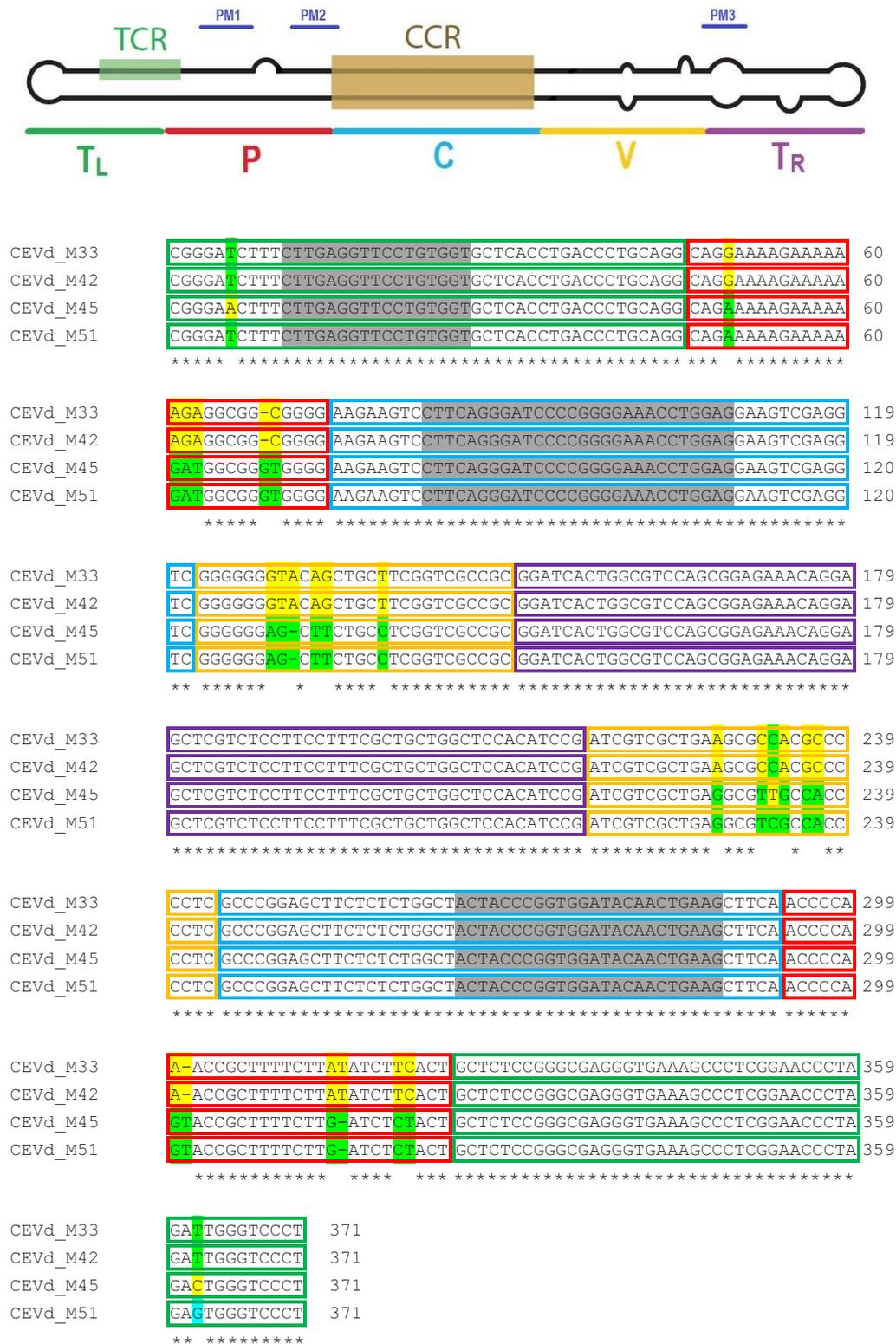


Figura 25: Alineamiento de las secuencias de CEVd provenientes de las cuatro muestras seleccionadas M33, M42, M45 y M51. En el panel A se muestra la estructura secundaria del viroide con la ubicación aproximada de los dominios en distintos colores: terminal izquierdo (T_L) verde, patogénesis (P) rojo, central (C) celeste, variable (V) naranja y terminal derecho (T_R) en violeta; y en azul las regiones pre-melting (PM). En el panel B se muestra el alineamiento entre las secuencias consenso de las muestras M33, M42, M45 y M51 realizado con CLUSTAL O, versión 1.2.4. Se resaltan en verde y amarillo los cambios en nucleótidos, y con distintos colores la ubicación de los dominios al igual que en el panel A. Además, se marca con gris las regiones conservadas terminal (TCR) sobre el dominio T_L, y la central (CCR) en el dominio C según Murcia *et al.* (2011).

Al comparar dichas secuencias vemos que las cuatro tienen 371 nucleótidos de longitud, y que M33 (371nt) y M42 (371nt) son 100% idénticas. Las secuencias M45 (371nt) y M51 (371nt) comparten entre sí más similitud (99,19% de identidad), difiriendo entre sí en 3nt ubicados en el dominio variable y en el T_L. Las secuencias de M33 y M42 difieren con M45 y M51 en más nucleótidos, y dichas variaciones se localizan en los dominios patogénicos y variables como puede verse en la Figura 25. Estas variaciones se asemejan a reportes previos como se detalla a continuación.

Según lo reportado por Visvader y Symons (1985), los aislamientos de CEVd pueden clasificarse en dos grupos: el **A** que corresponde a aislados severos, y el **B** que genera sintomatología leve. Dicho reporte asoció estos grupos, a dos regiones de la secuencia que se ubican en las zonas patogénicas y variables, y a cambios específicos en las mismas.

En la primera región, ubicada en la zona patogénica, la secuencia 5'-AGAGGCGGCGGGGAAGAA-3' (entre los nucleótidos 61 y 70 aproximadamente) corresponde a un aislamiento severo, mientras que la secuencia 5'-GAUGGCGGUGGGGAAGAA-3' (ubicada entre los mismos nucleótidos) determina una variante leve. En la secuencia se resaltan los nucleótidos que difieren entre ambas variantes.

En la segunda región ubicada en hebra inferior de la zona variable, la secuencia 5'-UGAAGCGCCUCGC-3' (entre los nucleótidos 228 y 237 aproximadamente) corresponde a un aislamiento severo, mientras que la secuencia 5'-UGAGGCGUCGCCA-3' sería leve.

En la Figura 26, se muestra la estructura secundaria de las regiones involucradas en la sintomatología de CEVd, con los cambios puntuales remarcados.

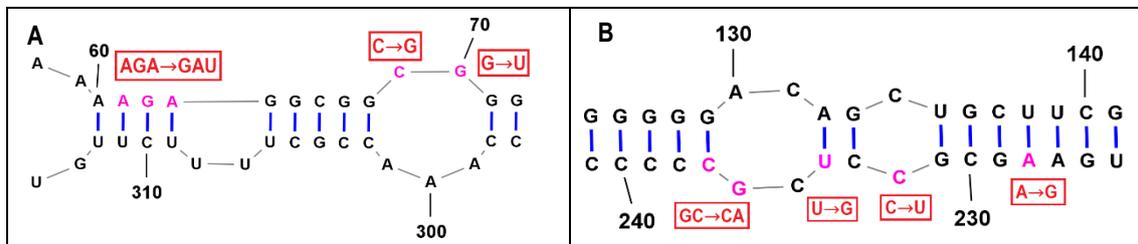


Figura 26: Secuencia y estructura de la región 1 (A) y de la región 2 (B). Se resaltan en cajas rojas los cambios para pasar de una variante severa → leve. Los números indican la posición dentro de la secuencia completa del viroide.

Para analizar las secuencias obtenidas y definir a qué grupo pertenecen, se utilizaron las secuencias de referencia depositadas en *GenBank* para ambos grupos A (severo) y B (leve) (M30868.1 y M30870.1, respectivamente), ambas provenientes de aislamientos de Australia. En la Tabla 10 se detallan los porcentajes de identidad que surgen de la comparación.

Muestra	Identidad de secuencia (%)	
	CEVd severo (M30868.1)	CEVd leve (M30870.1)
M33	98,12%	93,35%
M42	98,12%	93,35%
M45	93,05%	98,39%
M51	93,57%	98,93%

Tabla 10: Identidad de secuencia obtenidos con BLASTn al alinear las secuencias reconocidas de cada grupo con las muestras secuenciadas en este trabajo.

Según este alineamiento y la clasificación antes mencionada, las secuencias M33 y M42 pertenecen al grupo A siendo severas, mientras que M45 y M51 son leves perteneciendo al grupo B.

A continuación, se alinearon las secuencias de M33 y M42 con la secuencia reportada como severa (M30868.1) para analizar puntualmente los cambios (Figura 27), y lo mismo se hizo con M45 y M51, pero con la secuencia reportada como leve (M30870.1) (Figura 28).

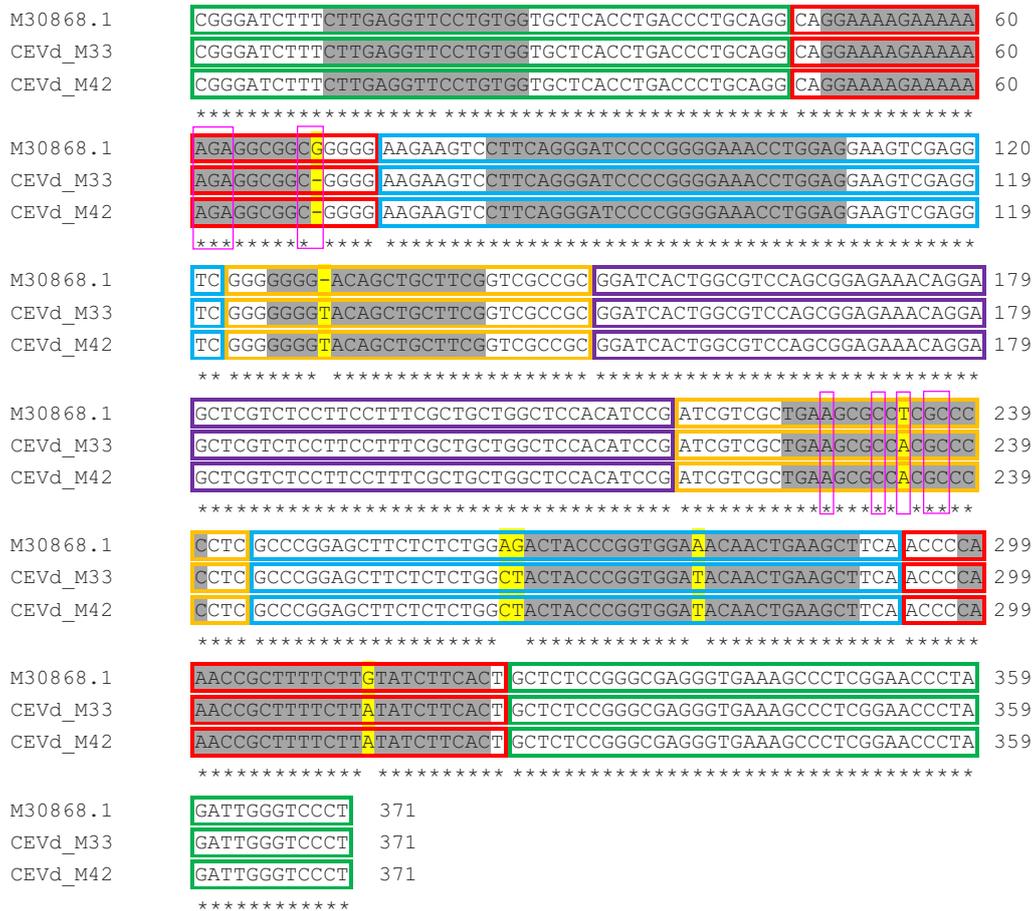


Figura 27: Alineamiento de secuencias consenso de las muestras M33 y M42, con la secuencia reportada como Clase A de CEVd (M30868). Se remarca con distintos colores la ubicación de los dominios: terminal izquierdo (T_L) verde, patogénesis (P) rojo, central (C) celeste, variable (V) naranja y terminal derecho (T_R) en violeta. Además, se marca con gris las regiones conservadas terminal (TCR) sobre el dominio T_L, la central (CCR) en el dominio C, y los motivos P_L y P_R en los dominios P y V, respectivamente, según Murcia *et al.* (2011). Se resaltan en amarillo los cambios entre las secuencias, y se marca con recuadros fucsia los nucleótidos que cambian entre variante leve/severa. Alineamiento múltiple con CLUSTAL O, versión 1.2.4.

A partir del alineamiento de las secuencias de M33/M42 con CEVd A (M30868) se ve que las regiones que determinan que sean variantes severas se mantienen en su mayoría, excepto por dos nucleótidos, uno en cada región (posiciones 70 y 234), que no se conservarían, como puede verse en la Figura 27 (en amarillo y recuadro fucsia). Por fuera de dichas regiones, se observan cuatro cambios más, ubicados tres de ellos en el dominio central, uno de ellos modificando la secuencia de la región central conservada (CCR), y otro en el dominio patogénico (posiciones 263, 264, 277 y 313, respectivamente).

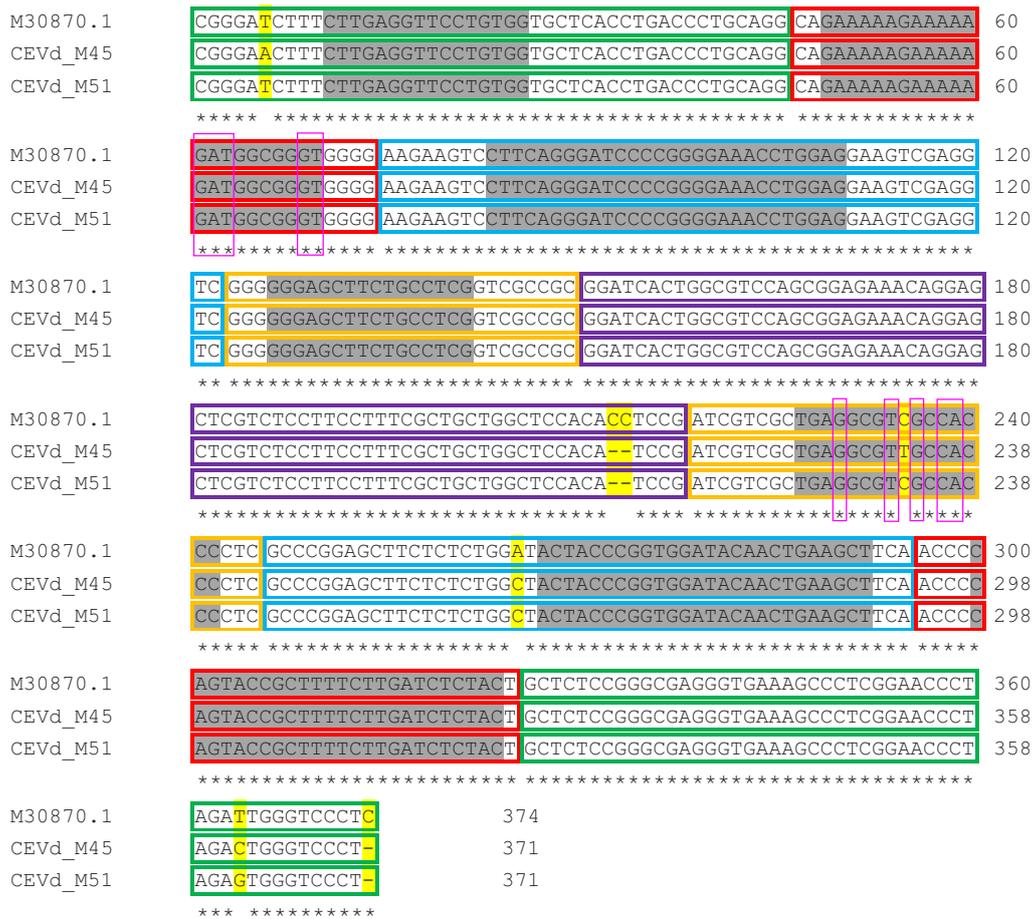


Figura 28: Alineamiento de secuencias consenso de las muestras M45 y M51, con la secuencia reportada como Clase B de CEVd (M30870). Se remarca con distintos colores la ubicación de los dominios: terminal izquierdo (TL) verde, patogénesis (P) rojo, central (C) celeste, variable (V) naranja y terminal derecho (TR) en violeta. Además, se marca con gris las regiones conservadas terminal (TCR) sobre el dominio TL, la central (CCR) en el dominio C, y los motivos PL y PR en los dominios P y V, respectivamente, según Murcia *et al.* (2011). Se resaltan en amarillo los cambios entre las secuencias, y se marca con recuadros fucsia los nucleótidos que cambian entre variante leve/severa. Alineamiento múltiple con CLUSTAL O, versión 1.2.4.

El alineamiento de las secuencias de M45/M51 con CEVd B (M30870) permitió ver que las posiciones que determinan la inclusión de los aislamientos en variantes leves son 100% idénticas. Se encontró un nucleótido diferente en la región 2 (posición 235) pero que no forma parte de los nucleótidos reportados puntualmente. Por fuera de dichas regiones, se observan seis cambios ubicados en los dominios TL, central y TR, ninguno de estos en regiones conservadas. Tres se ubican en el dominio TL, dos en el TR y uno en el dominio central.

Se analizó además la estructura secundaria de las secuencias en ambas regiones 1 y 2. La ausencia de proteínas específicas en los viroides implica que el proceso de infección es iniciado por la interacción directa entre uno o más determinantes estructurales del viroide con algún factor del hospedante. Es por esto que es muy importante su estructura secundaria, ya que de eso dependerá si logra o no infectar, y/o causar síntomas en el hospedante (Sano *et al.*, 1992; Murcia *et al.*, 2011). Las estructuras secundarias fueron obtenidas con *RNAstructure Web Server* versión 6.0.1 (Reuter y Mathews, 2010). Las estructuras más estables se compararon con las obtenidas para las secuencias reportadas para los grupos A y B. Se logró corroborar la conservación de motivos estructurales para las variantes leves, pero no así para los aislamientos categorizados

como severos (Figura 29). Las regiones reportadas corresponden a las patogénicas P_L y P_R, de los dominios P y V, respectivamente. Las muestras M33 y M42 no conservan motivos estructurales como la Clase A, ni en la región P_L ni P_R. Al parecer, la inserción del nucleótido “A” en la posición 129 en las secuencias de las muestras M33 y M42, genera un cambio en el orden de hibridación entre ambas hebras, lo que modifica el primer *loop* de P_R, y a su vez repercute en el segundo *loop* de esa misma región.

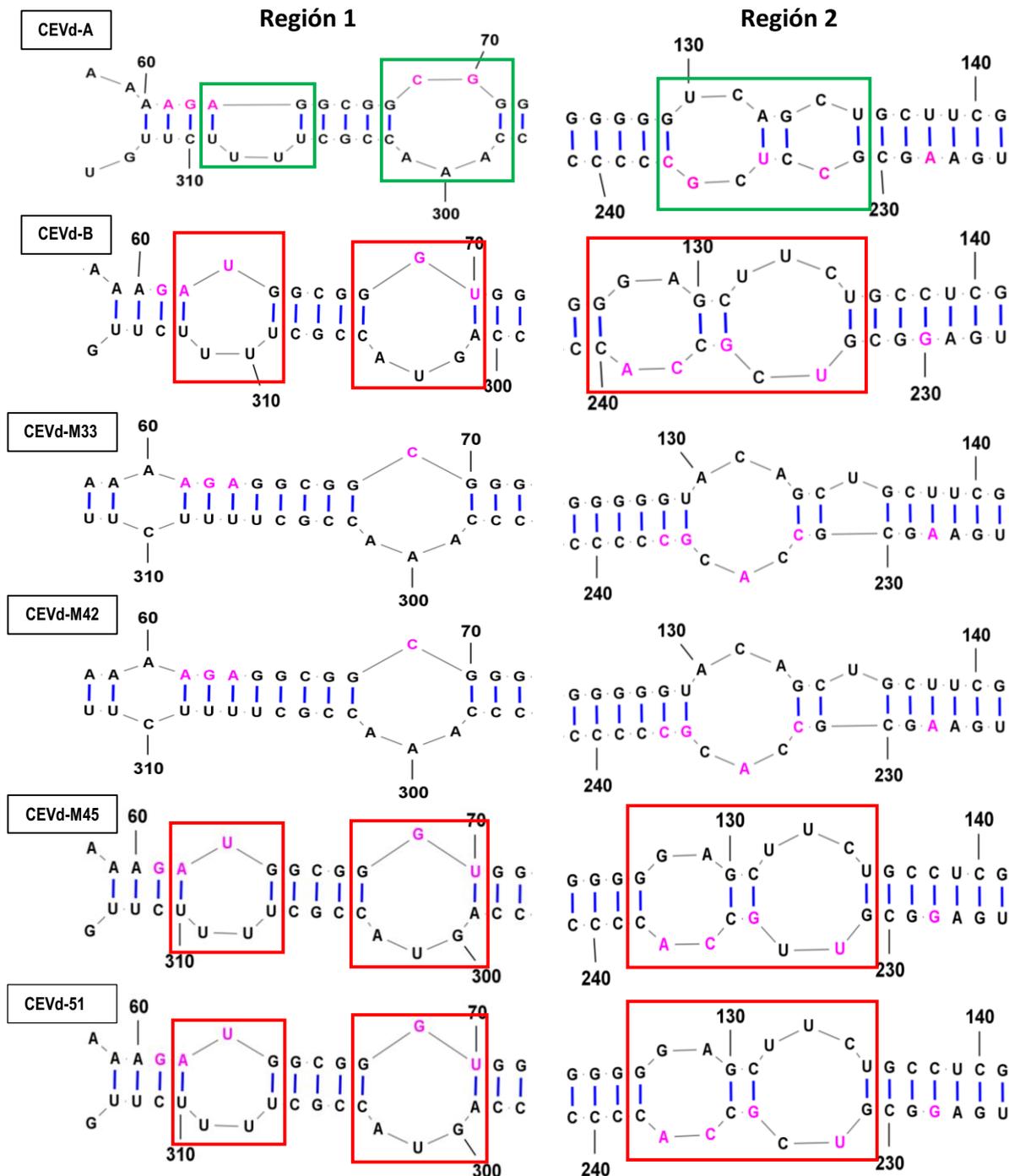


Figura 29: Estructura secundaria de las secuencias reportadas de los grupos A (M30868.1) y B (M30870.1) para CEVd, y del consenso para las muestras M33, M42, M45 y M51 en las regiones 1 (panel izquierdo) y 2 (panel derecho). En cajas se marcan diferencias en la estructura secundaria.

Si se evalúa la conformación secundaria completa adoptada para las secuencias de M33 y M42, las mismas contienen 31 *loops* (ANEXO IV), igual a la secuencia reportada de la Clase A (M30868.1), pero las modificaciones visualizadas generan cambios en esos *loops*, ya sea cambiando el tamaño de los mismos, el orden o la composición de nucleótidos. Se vio que los cambios por fuera de las regiones 1 y 2, repercuten modificando los *loops* 10, 11, 12, 15, 21 y 22.

Una situación similar ocurre para las secuencias correspondientes a las muestras leves M45 y M51, sólo que al parecer no alteran los motivos de la conformación secundaria, conservándose

idénticos a los de CEVd Clase B en las regiones 1 y 2. Se encontraron algunas variaciones por fuera de estas regiones. Entre ambas muestras hay diferencias de secuencias y por ende de estructura. La estructura secundaria de M45 contiene un *loop* más que M51 y que la secuencia correspondiente al CEVd Clase B. Los principales cambios conformacionales con respecto a CEVd B se detectaron en el *loop* 1 de M45 y M51, y en los *loops* 2 y 3 de M51 que resultan en cambios de tamaño de los mismos. Otro cambio que se observa en ambas secuencias con respecto a la secuencia reportada de CEVd Clase B, es en el *loop* 27 donde la delección de las bases CC en el dominio T_R provocan un *loop* de menor tamaño. Las demás variaciones son sólo cambios de nucleótidos pero que no afectan el orden o tamaño de los *loops*. Las estructuras secundarias de los aislamientos y de las secuencias reportadas se pueden ver en el ANEXO IV.

Existe otro trabajo que caracterizó algunas regiones de patogenicidad en la secuencia de CEVd, el cual es de Murcia y colaboradores 2011. Si bien uno de los cambios puntuales coincide con los reportes de Visvader y Symons (1985), varios de los otros son diferentes. Se describen cinco cambios de nucleótidos (sintomatología leve a severa: 63-A, 186A→U, 235U→A, 314G→A, 315A→U) entre un aislamiento que no genera síntomas en cidra Etrog y uno que sí los provoca y de forma severa. Analizando esas posiciones en las secuencias de los aislamientos M33 y M42 se verificó que los nucleótidos coinciden 100% en ambas muestras severas, corroborando que dichas secuencias pertenecen a una variante severa y coincidiendo con los resultados de las comparaciones con los determinantes publicados por Visvader y Symons (1985). Con respecto a las muestras M45 y M51 no coinciden 100% con la variante leve o sin síntomas, sólo coinciden en dos de las cinco posiciones. Esto podría ser consistente con un comportamiento intermedio de los aislamientos M45 y M51, que al menos para M51 que se presenta sólo y provocan síntomas leves, mientras que los cambios reportados en Murcia *et al.* (2011) son para una variante que no causa síntomas en cidra, aunque sí los genera en tomate. No se puede corroborar lo mismo para M45 ya que en cidra Etrog está en mezcla con HSVd y CDVd.

Un tercer trabajo de Hajeri y colaboradores (2011), también describe cambios puntuales en la secuencia de CEVd implicados en la sintomatología. Se asocian ciertas posiciones y cambios de nucleótidos, con variantes más o menos infectivas en diferentes hospedantes como cidra Etrog, gynura (*Gynura aurantiaca*) y crisantemo (*Dendrathera morifolium*), y también lo asocian con la estabilidad genética de las mismas. Las posiciones allí descritas como asociadas a variantes más infectivas y estables, no están presentes en las muestras analizadas en el presente trabajo, pero vimos que los cambios presentes en las secuencias que generan una secuencia no infectiva no se observan en su mayoría, en los aislamientos del presente trabajo. Las posiciones 30 U→C y 182 U→C, caracterizadas como como posiciones determinantes de severidad, se mantienen iguales a la original, las cuales corresponden a variantes menos infectiva, mientras que en la ubicación 128 G→A, la G corresponde a una variante infectiva mientras que A no. Las muestras M33 y M42 contienen G en la posición 128, mientras que M45 y M51 poseen A, lo cual coincide con el perfil de severidad observado en estos aislamientos y con los análisis realizados para los determinantes descritos por Visvader y Symons (1985) y Murcia y colaboradores (2011). Otros cambios en diferentes posiciones reportados por Hajeri y colaboradores (2011) corresponden a nucleótidos que generan variantes infectivas pero que no son estables. Estas son 50 G→A y 108 +U. Esta última inserción no se encuentra presente en ninguno de los aislamientos analizados,

pero si está el cambio en la base 50, donde los aislamientos severos M33 y M42 presentan G, mientras que M45 y M51 tienen una A en dicha posición.

Dentro de la caracterización molecular de los aislamientos de esta tesis se llevaron a cabo algunos estudios filogenéticos para analizar las posibles asociaciones entre los aislamientos de este trabajo y otros provenientes de diferentes ubicaciones geográficas depositadas en GenBank, teniendo en cuenta diferentes variantes cuando fue posible, según lo publicado. Estos análisis se realizaron a través del software MEGA versión 11.0.13, utilizando el método estadístico de *Neighbor-joining* para la generación de los árboles filogenéticos. La distancia entre nucleótidos se estimó siguiendo el modelo de Jukes y Cantor (Figura 30).

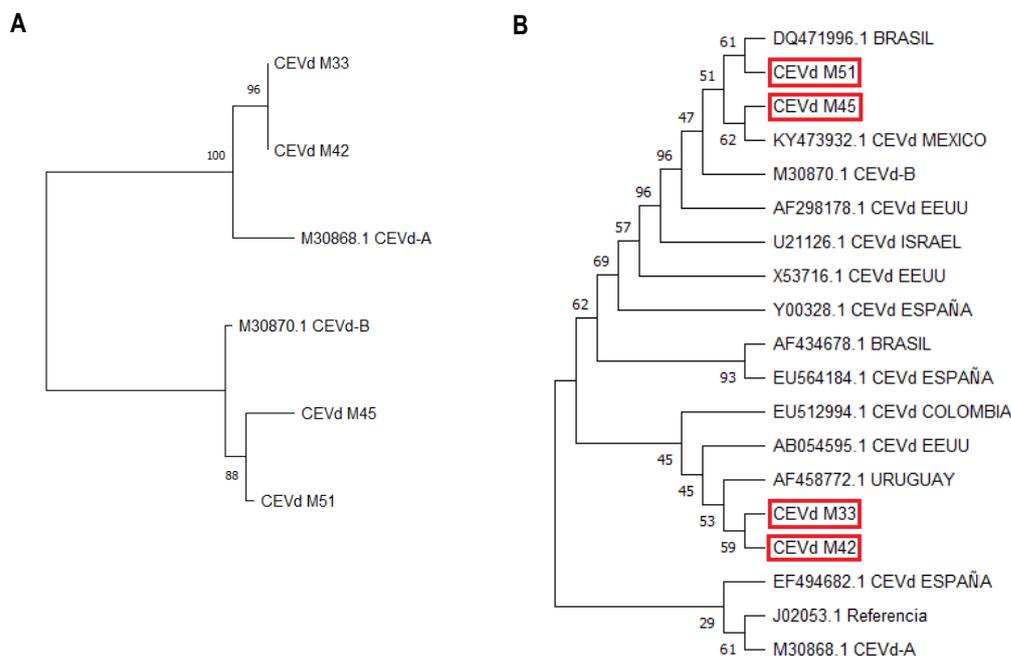


Figura 30: Análisis filogenético de los aislamientos seleccionados por el método Neighbor-joining. A) Árbol filogenético construido con Mega 11.0.13 a partir de las secuencias nucleotídicas de los aislamientos de M33, M42, M45, M51 y las secuencias reportadas de CEVd Clase A y B de Visvader y Symons (1985). B) Árbol filogenético construido con las secuencias de M33, M42, M45, M51 y algunas secuencias depositadas en *GenBank* provenientes de países de América Latina, además de la secuencia referencia de CEVd (J02053) y las secuencias reportadas de CEVd Clase A y B de Visvader y Symons (1985). Con marcos rojos se señalan las secuencias de este trabajo. Con línea verde se marca a la derecha los tres agrupamientos que se formaron. La historia evolutiva se infirió con el método Bootstrap y el soporte de ramas se realizó con el método de bootstrapping (10000 réplicas). Los números en los nodos indican el porcentaje del test Bootstrap.

Los análisis filogenéticos confirman las asociaciones entre los aislamientos M33 y M42 con CEVd Clase A, y M45 y M51 con CEVd Clase B (Figura 30 A). Analizando el árbol de la Figura 30 B, se podría inferir el origen de los aislamientos, considerando aquellos países con Bancos de Germoplasma desde los cuales el INASE (Instituto Nacional de Semillas) habilita a Argentina para importar material cítrico de manera oficial. Estos países incluyen Estados Unidos, Israel y España. Además, hemos considerado países de América Latina por su cercanía. Los aislamientos examinados en este trabajo parecen estar más estrechamente relacionados con muestras procedentes de Uruguay, Brasil y México. En el caso de los dos primeros, podría atribuirse simplemente a la proximidad geográfica y a una mayor vinculación entre estos países. Además, observamos la formación de tres grandes grupos o asociaciones, y dejando

de lado los países de América Latina, notamos un mayor acercamiento a aislamientos provenientes de Estados Unidos.

Los aislamientos severos según el árbol filogenético construido (Figura 30 B) se agrupan con aislamientos de Uruguay, Estados Unidos, Colombia y España, respondiendo probablemente a la cercanía geográfica y/o movimientos de material cítrico.

2.C. Caracterización biológica de aislamientos de CEVd, mediante observación de sintomatología y análisis de la acumulación en plantas de tomate.

Para continuar con la caracterización de cada aislamiento perteneciente a las diferentes muestras seleccionadas y seguir analizando la correlación entre la severidad de los síntomas con determinantes de secuencia, se planteó la inoculación de un hospedante alternativo que permita ver diferencias sutiles en sintomatología. Para el viroide CEVd se ha reportado la utilización de tomate en estos ensayos ya que permite ver sintomatología y/o acumulación del viroide en la planta en un corto periodo. La sintomatología de este viroide en tomate incluye retraso del crecimiento y epinastia (Cottilli *et al.*, 2019).

Las muestras elegidas para este estudio fueron dos de las cuatro analizadas en la sección anterior: la M33 y M51. La muestra M33 corresponde, según el análisis de secuencias, al grupo A (severa), y M51 representa al grupo B (leve). Para este ensayo se decidió inocular cuatro plantines de tomate variedad Platense con extracto recuperado del aislamiento de CEVd de las respectivas muestras M33 o M51. Además, se inocularon cuatro plantines con una muestra control T(+) 5-8 proveniente del banco de testigos de CEVd pertenecientes a la Estación Experimental Agropecuaria INTA Concordia, y otros cuatro sin inoculación (control negativo). El testigo T(+) 5-8 de CEVd ha sido secuenciado y se verificó que presenta un determinante de secuencia de cada región de patogenicidad descrita por Visvader y Symons (1985), siendo la región 1 similar a la variante severa, mientras que la región 2 se asemeja a la variante leve.

A los treinta días post-inoculación se evaluó la presencia de síntomas, se registró la altura de los plantines, y se procedió a realizar extracción de ARN para el posterior diagnóstico por RT-qPCR. En la Tabla 11 se detallan los síntomas observados y la altura de cada plantín, y en la Figura 31 se muestran fotos de los plantines al momento de la evaluación.

N° de plantín	Muestra	Determinante de secuencia	Altura (cm)	Promedio altura (cm)	Sintomatología	RT-qPCR
1	M33	A (severa)	26.0	27.4	Enrollamiento muy leve del borde de las hojas	+
2	M33		31.5		Enrollamiento muy leve del borde de las hojas + epinastia leve	+
3	M33		27.0		Sin síntomas	+
4	M33		25.0		Sin síntomas	+
5	M51	B (leve)	35.5	29.25	Enrollamiento muy leve del borde de las hojas + epinastia en parte superior	+
6	M51		29.5		Epinastia en algunas hojas	+
7	M51		27.0		Sin síntomas	+
8	M51		25.0		Sin síntomas	+
9	T(+) 5-8	A/B	31.0	33.3	Sin síntomas	+
10	T(+) 5-8		34.0		Sin síntomas	+
11	T(+) 5-8		37.0		Sin síntomas	+
12	T(+) 5-8		31.0		Sin síntomas	+
13	Control	-	31.5	29.1	Sin síntomas	-
14	Control	-	28.0		Sin síntomas	-
15	Control	-	32.0		Sin síntomas	-
16	Control	-	25.0		Sin síntomas	-

Tabla 11: Altura y sintomatología observada en los plantines de tomate Platense inoculados con aislamientos de CEVd.

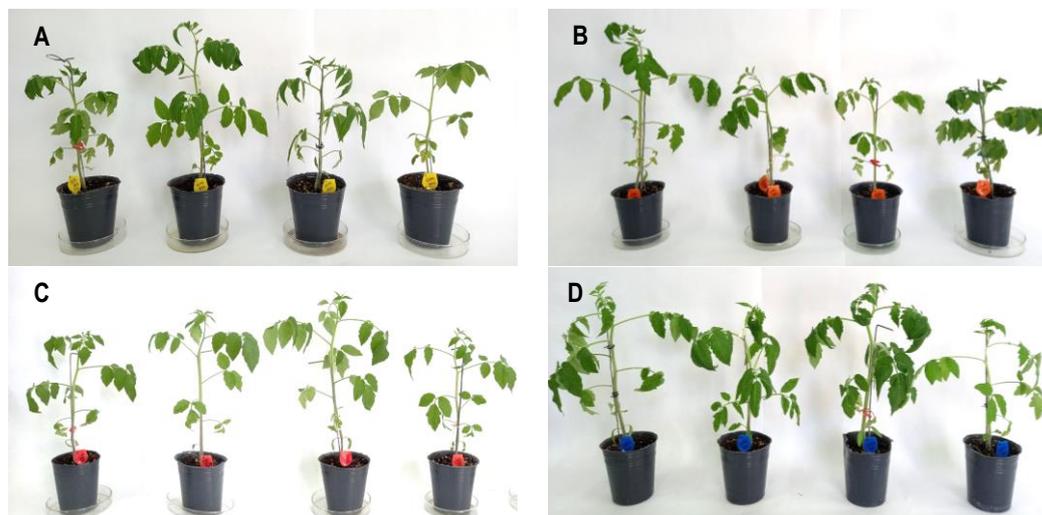


Figura 31: A) plantines del 1 al 4 inoculados con aislamiento de CEVd de la muestra M33; B) plantines del 5 al 8 inoculados con aislamiento de la muestra M51; C) plantines del 9 al 12, inoculados con el control positivo proveniente del Testigo 5-8; D) plantines del 13 al 16, sin inocular, control negativo.

La altura promedio de los plantines inoculados con el aislamiento severo (M33) es menor que el promedio de la altura de los plantines inoculados con el aislamiento leve (M51) y el aislamiento control T(+) 5-8. Al realizar un test de ANOVA no se evidenciaron diferencias significativas entre las alturas de los plantines inoculados con las distintas muestras y el control negativo (p valor = 0,7850). La sintomatología observada en referencia a la morfología de las plantas y hojas no demostró diferencias entre los aislamientos.

Se procedió posteriormente a evaluar la acumulación de CEVd en los plantines de tomate inoculados mediante RT-qPCR. Para ello se utilizaron cebadores que amplifican al viroide completo, y como controles internos se utilizaron ubiquitina y citocromo oxidasa (COX). Se determinó la cuantificación relativa normalizada a los dos genes de referencia mediante el método *Pfaffl* utilizando los valores brutos de Ct obtenidos tanto de CEVd como para COX y ubiquitina en cada plantín (Figura 32) (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).

Con los valores de la cuantificación relativa se realizó un ANOVA utilizando el software GraphPad 8.0.2 para ver si hay diferencias significativas entre las muestras. El nivel de acumulación de CEVd en los plantines inoculados con el aislamiento de M33 fue más elevado que con M51 y T(+) 5-8. Esta relación resultó estadísticamente significativa (según ANOVA y test de Tukey) para la comparación entre M33 y M51 con un p-valor= 0,0424 (Figura 32).

Se realizó posteriormente un test de ANOVA y se verificó que el nivel de acumulación de CEVd en los plantines inoculados con el aislamiento severo M33 fue más elevado que con el leve M51 y T(+) 5-8 (de comportamiento intermedio). Esta relación resultó estadísticamente significativa (según ANOVA y test de Tukey) para la comparación entre M33 y M51 con un p-valor = 0,0424 (Figura 32).

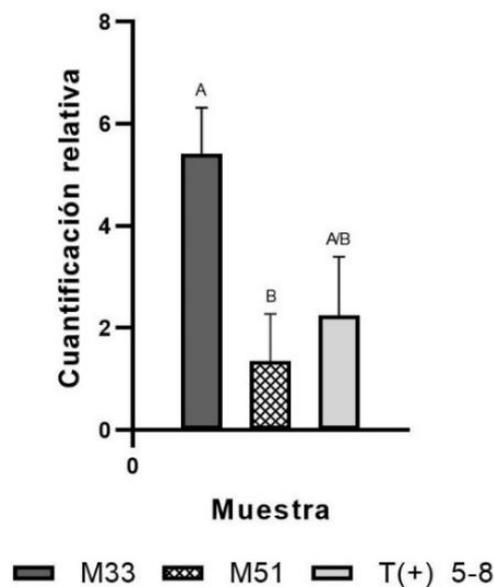


Figura 32: Acumulación de CEVd en plantines de tomate inoculados con los aislamientos provenientes de las muestras M33 y M51, y del control positivo (T(+) 5-8). Los datos se normalizaron utilizando dos controles internos: los genes de ubiquitina y citocromo oxidasa. Para la cuantificación relativa se utilizó el método *Pfaffl*. Sobre cada barra se representa el error estándar de la media (SEM). Se realizó un ANOVA seguido de un *Test Dunnett* revelando diferencias significativas entre M33 y M51 (p valor=0,0424). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras.

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis, se lograron obtener las secuencias nucleotídicas completas de CEVd a partir de cuatro muestras M33, M42, M45 y M51. Con las secuencias obtenidas se logró identificar y caracterizar dichos aislamientos.

Se crearon árboles filogenéticos con algunas secuencias reportadas de otros países, viendo un acercamiento con secuencias procedentes de Uruguay, Brasil y México que podría atribuirse a la proximidad geográfica, o a una vinculación y flujo de material entre países en el caso de México. Además de la asociación con países de América Latina, se evidenció asociaciones de las muestras identificadas en el presente trabajo con aislamientos de Estados Unidos.

Conociendo la conformación secundaria de cada aislamiento y los cambios presentes en las secuencias de cada dominio, se pudo confirmar asociaciones con los grupos categorizados como leves o severos. También se evidenció una mayor acumulación en tomate de aquellos aislamientos con características y determinantes severos. A continuación, se presenta una tabla que resume los resultados obtenidos para las muestras evaluadas en las distintas etapas (Tabla 12).

Muestra	Síntomas en naranjo a campo	Síntomas en cidra Etrog	Cuantificación relativa por RT-PCR en cidra Etrog* (incremento respecto a la muestra de referencia)	Síntoma en tomate	Cuantificación relativa en tomate* (incremento respecto a la muestra de referencia)	Presencia de HSVd/CDVd	Secuencia
M33	Enanismo moderado, descortezado severo en el pie y presencia leve de huecos y acumulación de goma debajo de la corteza	Severo	0,11	Resultados no concluyentes	5,42	Si	Severa
M51	Enanismo leve, descortezado severo, presencia severa de huecos y acumulación de goma. Planta con menos follaje y amarillenta.	Moderado	0,38		1,35	No	Leve

Tabla 12: Resumen de resultados obtenidos en las distintas evaluaciones de las muestras M33 y M51.

*promedio de la cuantificación en los cuatro plantines

Los resultados de sintomatología en cidra y acumulación en tomate confirman que la M33 corresponde a un aislamiento de CEVd del grupo severo ya que, tanto en campo, como en cidra Etrog y en tomate la sintomatología y/o acumulación mostró este perfil. Aunque en el ensayo de tomate no se observaron síntomas, se lograron detectar diferencias significativas entre la acumulación de CEVd en ambos aislamientos, que atribuimos a la diferencia de sus secuencias y por ende a la severidad de cada variante. La ausencia de síntomas en tomate podría deberse a que la M33 posee cambios adicionales por fuera de las regiones P_L y P_R, respecto a las secuencias reportadas como CEVd severas, que podrían llevar a alteraciones en la conformación secundaria y a un comportamiento más moderado en este hospedante. O también debido a que las estructuras secundarias tanto en la región 1 y 2 no coinciden con las que presenta un aislamiento de Clase A.

Las secuencias de los aislamientos de CEVd de M33 y M42, coinciden con la variante severa según lo reportado por Visvader y Symons (1985) y Murcia *et al.* (2011), mientras que los aislamientos M45 y M51 coinciden con la variante leve de Visvader y Symons (1985), pero no con la de Murcia *et al.* (2011). Se debe considerar que Murcia *et al.* (2011) reporta una variante CEVd^{COL} que no genera síntomas en cidra Etrog, pero si en tomate, y atribuye este comportamiento a dos cambios puntuales en los nucleótidos 314 y 315 del PL. Nuestras secuencias de M45 y M51 coinciden sólo en 1 nucleótido de los dos mencionados, por lo que podría correlacionarse la respuesta leve de estos aislados en cidra con los cambios observados. Para el caso de la M51, el aislamiento de CEVd venía en infección simple desde campo manifestando sintomatología moderada, lo que lo diferencia de CEVd^{COL} que no da síntomas, por lo que no coinciden ni en sintomatología ni es secuencia.

Con respecto a la ubicación geográfica de las muestras sólo se puede ver una tendencia de mayor severidad de aislados en el sur de la región (M33 y M42) y leves al norte (M45 y M51) en cuanto a las secuencias de los aislamientos de CEVd.

En relación a las variantes presentes en cada muestra y su combinación o no con los demás viroides, se ve una posible correlación en cuanto a la combinación con HSVd y CDVd, y la variante de CEVd presente según la sintomatología que causa en cidra Etrog. Cuando se combina una variante severa de CEVd con HSVd/CDVd (M33) se observa mayor sintomatología en cidra, en comparación con la misma combinación de estos viroides, pero con una secuencia leve de CEVd (M45), donde causa sintomatología moderada.

Analizando puntualmente las dos muestras donde CEVd es severo en cidra (M33 y M42), se vió que la M33 causa síntomas severos, pero se encuentra en combinación con HSVd y CDVd, mientras que en la M42 se encuentra sólo y los síntomas que provoca son moderados. Estos resultados sugieren un escenario de sinergismo entre especies de viroides.

Finalmente, estos resultados revelan la presencia en Argentina de cepas de CEVd, algunas de las cuales muestran características leves mientras que otras exhiben una mayor agresividad.

Capítulo 3
Hop stunt viroid

INTRODUCCIÓN

Hop stunt viroid (HSVd) fue identificado por primera vez en plantas de lúpulo (*Humulus lupulus*) (Sasaki y Shikata, 1977) pero afecta a otros cultivos, como vid, cítricos, ciruela y melocotón. Es el viroide con mayor gama de hospedantes naturales y existen variantes de esta especie con diferentes movilidades electroforéticas, con tamaños que rondan los 294-305 nucleótidos (Hataya *et al.*, 2017; Marquez-Molins *et al.*, 2021). Cuando se obtuvo la secuencia nucleotídica se pudo saber que dos de sus variantes tenían tamaños de 299 y 302 nucleótidos, siendo CVd-IIb y CVd-IIa, respectivamente (Sano *et al.*, 1988; Murcia, 2009; Serra, 2009).

Reanwarakorn y Semancik (1998) estudiaron la patogenicidad de CVd-IIa y CVd-IIb comparando sus secuencias y actividad biológica. Utilizaron como hospedantes experimentales a luffa (*Luffa aegyptiaca* Mill.) y mandarina Parson Special, y mediante la construcción de quimeras intraespecíficas entre las dos variantes crearon mutantes del viroide artificiales, lo que les permitió conocer que la patogénesis estaba determinada por la presencia de un motivo de 6 nucleótidos localizados en el dominio V de la estructura secundaria del viroide. Gracias a esto, se confirmó que el motivo de expresión de la caquexia estaba conformado por los 5-6 nucleótidos ubicados en el dominio V, responsable de la inducción de los síntomas de caquexia, y que cambios mínimos dentro de esta región influyen sobre la agresividad de los síntomas e incluso pueden suprimir la expresión de los mismos (Reanwarakorn y Semancik 1998; Murcia, 2009).

El Grupo CVd-II de viroides, además, se compone por una tercera variante llamada CVd-IIc, la cual induce síntomas más moderados en mandarina Parson Special, y es considerada junto a CVd-IIb como agentes causantes de la caquexia (Semancik y Duran-Vila, 1991). La variante CVd-IIa no provoca caquexia.

El rango de hospedantes de los diferentes viroides es muy variable, siendo HSVd uno de los que mayor espectro de hospedantes tiene. Dada esta característica, múltiples estudios utilizan HSVd como modelo, aportando conocimiento de las interacciones viroide-hospedante, movimiento de larga distancia, resistencia al silenciamiento mediado por ARN, la patogénesis y las alteraciones epigenéticas. Todas las variantes de HSVd inducen síntomas de retraso del crecimiento, rugosidad foliar y epinastia en pepino (Van Dorst y Peters, 1974; Sasaki y Shikata, 1977 a y b; Marquez-Molins *et al.*, 2021; Sano *et al.*, 1988; Palacio-Bielsa *et al.*, 2004; Serra, 2009) y síntomas muy leves en cidro, donde se encuentran en concentraciones más bajas que los demás viroides de los cítricos (Roistacher *et al.*, 1977; Duran-Vila *et al.*, 1993; Serra, 2009). Con el tiempo, se descubrió que pepino podía ser un hospedante indicador de HSVd, desarrollando síntomas en el rango de semanas, lo cual fue clave para caracterizar propiedades de HSVd (Figura 33) (Sasaki y Shikata, 1977 a y b; Marquez-Molins *et al.*, 2021).



Figura 33: Síntomas de HSVd en planta de pepino. En la planta inoculada (derecha) se observa retraso del crecimiento y distorsión en las hojas. La planta de la izquierda corresponde a un control sin inoculación (tomado de: Marquez-Molins *et al.*, 2021).

La utilización de plantas de pepino como indicadores data de mucho tiempo atrás. Los síntomas reportados principalmente en plantas de pepinos son hojas pequeñas, rugosas, con sus bordes doblados hacia abajo y clorosis en las nervaduras. Otro de los síntomas muy distintivos es la fruta, a la cual le provoca retraso de crecimiento y un color pálido. En pepino la severidad de los síntomas depende fuertemente de la temperatura, es por eso, que muchas veces no se los llega a percibir. Cuando las plantas crecen a 30°C, aparecen los síntomas en las hojas antes de la floración o del desarrollo de la fruta, y son más intensos. Además, se observa acortamiento de internodos como parte de la reducción de crecimiento, lo que hace que la planta parezca atrofiada (Van Dorst y Peters, 1974; Sasaki y Shikata, 1977 a y b; Marquez-Molins *et al.*, 2021).

3.A. Cuantificación de HSVd mediante RT-qPCR

Del total de muestras de campo recolectadas y analizadas en el capítulo 1 de este trabajo, se vio que el 62.96% estaban infectadas con HSVd, y que siempre se lo encontró asociado a CDVd o a CEVd y CDVd. Considerando sólo las muestras positivas para HSVd se lo encontró en un 41,2% de las plantas co-inoculando con los viroides CEVd y CDVd, y en un 58,8% junto a CDVd (Figura 34).

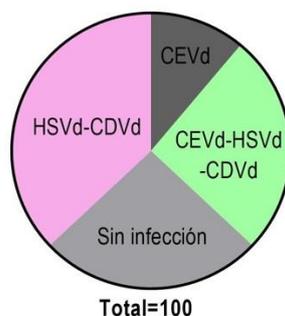


Figura 34: Porcentajes de aparición de HSVd en diferentes combinaciones en relación al total de plantas infectadas.

Las muestras de campo se inocularon en cidra Etrog desde donde se realizaron los diagnósticos mediante *indexing* biológico, sPAGE y RT-qPCR (Capítulo 1 del presente trabajo). Para el caso particular de este viroide, que acumula en niveles bajos en cidra, a veces la banda correspondiente al viroide podría no ser visualizada claramente en el gel del sPAGE o puede no ser identificada con certeza. Por esta razón, como resultado final se decidió considerar positivas a las que lo fueran por alguna de las técnicas. De todas maneras, no se presentaron resultados divergentes.

A continuación, se resumen los valores de la cuantificación relativa obtenida mediante RT-qPCR para HSVd realizada a los plantines de cidra Etrog inoculados con las muestras recolectadas de campo (Figura 35). Cada barra en el gráfico representa el promedio de cuantificación relativa obtenido a partir de los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo, y se muestra el error estándar medio de cada conjunto. Las desviaciones observadas se deben a que son promedios de cuatro réplicas biológicas y es lógico asumir que plantas distintas, no siempre presentarán un comportamiento idéntico en relación a la acumulación de viroides.

En cuanto a la acumulación de cada muestra, no pudimos dilucidar correlación clara con síntomas ni en campo ni en cidras. De todas maneras, cabe destacar que tres de las muestras que en promedio más acumularon HSVd según la cuantificación por RT-qPCR (M29, M44 y M47), mostraban síntomas moderados a severos en campo. Las muestras M44 y M47 coinciden en la sintomatología observada en cidra, ya que ambas son moderadas/severas, pero hay que tener en cuenta que ambas contienen también a CEVd, además de CDVd; no así M29 y/o M49 que también son unas de las que más acumulan HSVd.

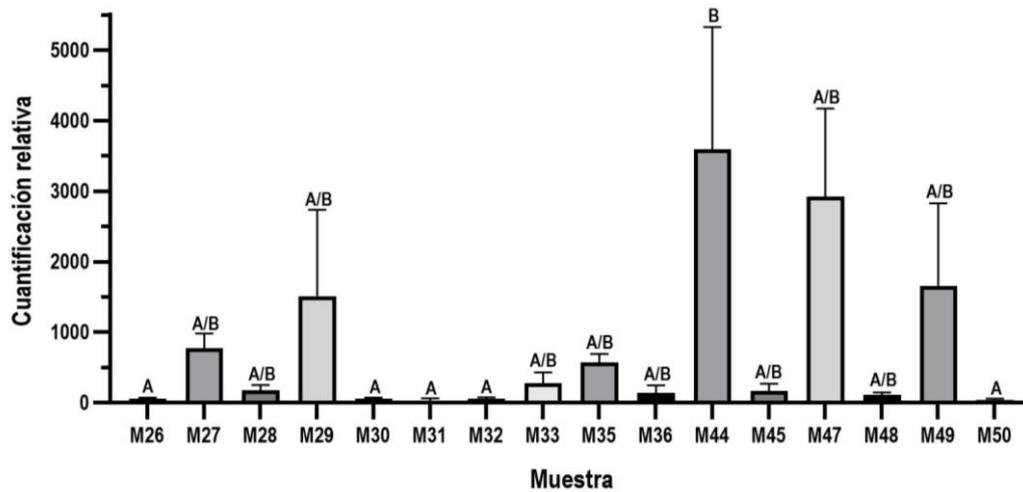


Figura 35: Cuantificación relativa mediante RT-qPCR de HSVd en plantines de cidra Etrog. Se presenta el promedio de los valores obtenidos para los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo que resultaron positivos para HSVd. Los datos se normalizaron utilizando dos controles internos: los genes de ubiquitina y citocromo oxidasa. Para la cuantificación relativa se utilizó el método *Pfaffl*. Sobre cada barra se representa el error estándar de la media (SEM). Se realizó un ANOVA seguido de un *Test Tukey* revelando diferencias significativas entre las muestras que acumulan menos (M26, M30, M31, M32 y M50) y la que acumula más (M44). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras.

Se realizó un test de ANOVA para ver si hay diferencias significativas entre las acumulaciones de las diferentes muestras, encontrándose sólo diferencia entre las que menos acumulan (M26, M30, M31, M32 y M50) vs M44 que es la que más acumula (p valor= 0,0062).

3.B. Caracterización molecular de aislamientos obtenidos de HSVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.

Para la caracterización molecular de las poblaciones de HSVd presentes en las áreas de recolección, se seleccionaron cuatro muestras. Los criterios de selección fueron el área geográfica a la cual pertenecían, la severidad de la sintomatología que se observó en la planta de campo cuando se tomaron las muestras, y en las plantas de cidra Etrog al año desde la inoculación. Las muestras elegidas fueron:

- La M29 que presenta síntomas leves, pertenece al área del Departamento Concordia y se encuentra sólo en mezcla con CDVd.
- La M33 que presenta síntomas severos extremos en cidra Etrog (al punto de que las plantas indicadoras se afectaron gravemente), pertenece al área del Departamento Concordia y se encuentra en mezcla con CDVd/CEVd.
- La M39 que presenta síntomas leves/moderados, pertenece al área del Departamento Federación y se encuentra sólo en mezcla con CDVd.
- La M48 que presenta síntomas principalmente moderados, pertenece al área del Departamento Monte Caseros y se encuentra en mezcla con CDVd/CEVd.

La caracterización molecular de los aislamientos de HSVd se llevó a cabo mediante el clonado y secuenciación de amplicones obtenidos por RT-PCR. Las amplificaciones se realizaron desde extractos de las cidras Etrog inoculadas con las muestras recolectadas en campo. Se secuenciaron un promedio de cinco clones por muestra de campo. Se obtuvo la secuencia consenso completa del viroide para cada muestra utilizando el software EMBOSS Cons del *EMBL's European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI). La Figura 36 muestra el alineamiento entre las cuatro secuencias consenso de M29 (PP588708), M33 (PP588709), M39 (PP588710) y M48 (PP588711).

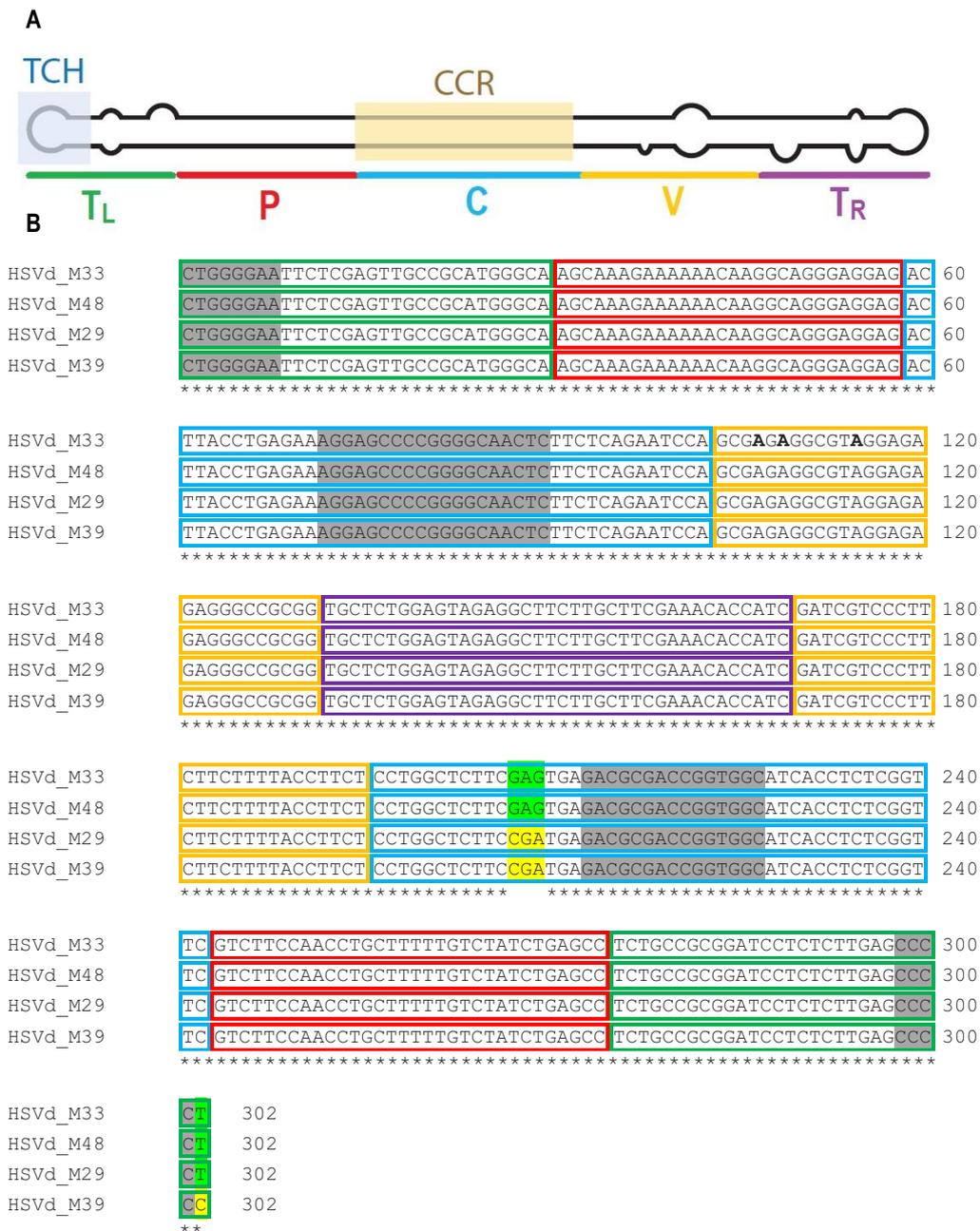


Figura 36: Alineamiento de las secuencias de HSVd provenientes de las cuatro muestras seleccionadas M33, M48, M29 y M39. En el panel A se muestra la estructura secundaria del viroide con la ubicación de los dominios en distintos colores: terminal izquierdo (T_L) verde, patogénico (P) rojo, central (C) celeste, variable (V) naranja y terminal derecho (T_R) en violeta. En el panel B se muestra el alineamiento de las secuencias consenso de las muestras M29, M33, M39 y M48 realizado con CLUSTAL O, versión 1.2.4. Se resaltan en verde y amarillo los cambios de nucleótidos entre las secuencias, y con colores la ubicación de los dominios al igual que en el panel A. Además, se remarca con gris la ubicación de la región central conservada (CCR) en C y del hairpin conservado terminal (TCH) en T_L basado en reportes previos (Palacio-Bielsa *et al.*, 2004; Serra, 2009).

Los cuatro aislamientos comparados tienen igual tamaño (302nts). El par de muestras M33/M48 poseen 100% de identidad nucleotídica, mientras que el par M29/M39 sólo se diferencia en un nucleótido. Los dos grupos que se establecen sólo varían en cuatro nucleótidos, 3 ubicados en el dominio central dentro del CCR, y uno en el extremo izquierdo (T_L) ubicado dentro del TCH.

Se ha reportado diferentes clases de HSVd según su secuencia, y en la clasificación se diferencian tres subgrupos, dos de los cuales generan la enfermedad caquexia en cítricos y uno que no la genera (categorización según Reanwarakorn y Semancik (1998, 1999)). Se describe además una

región de la secuencia asociada a la expresión de síntomas. En la Figura 37 se muestra la región donde varían las secuencias y los cambios puntuales que diferencian una variante que genera o no caquexia. Esta región está incluida en el dominio variable y comprende dos *loops* separados por una región helicoidal corta. Esta última, en las variantes caquexia tiene deleciones que la hacen más corta respecto a las variantes que no la provocan (Figura 37). En la estructura no-caquexia los dos *loops* contienen un único nucleótido desapareado, mientras que la estructura de caquexia siempre es simétrica conteniendo uno de ambos *loops* con dos nucleótidos desapareados (Figura 38). Estos cambios podrían afectar la geometría y estabilidad de la estructura, lo que podría ser crítico para ser reconocido y unirse a factores del hospedante, y así lograr la infección del hospedante, y/o generar sintomatología (Palacio-Bielsa *et al.*, 2004).

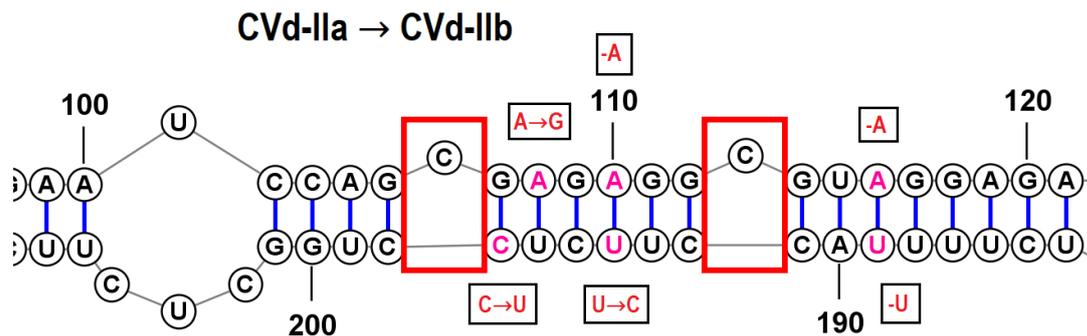


Figura 37: Cambios en la secuencia entre una variante que no genera caquexia (CVd-IIa) de una que sí (CVd-IIb) según lo reportado por Reanwarakorn y Semancik (1998). Las posiciones que cambian se muestran en fucsia. Las cajas muestran en rojo los cambios separados por una flecha. Los signos + son inserciones y los signos – son deleciones. Con marcos rojos se señalan los *loops* que cambian entre CVd-IIa y CVd-IIb.

Se realizaron alineamientos entre los aislamientos seleccionados (M29, M33, M39 y M48) y las secuencias de reportadas para las tres subclases de HSVd (Palacio-Bielsa *et al.*, 2004; Reanwarakorn y Semancik, 1999a). En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de identidad entre ellos.

Muestra	% de identidad		
	CVd-IIa non-caquexia (AF213503.1)	CVd-IIb caquexia (AF213501.1)	CVd-IIc caquexia (AF131250.1)
M29	98,68	96,38	94,74
M33	99,34	97,03	94,10
M39	98,68	96,37	94,72
M48	99,34	97,03	94,10

Tabla 13: Porcentajes de identidad de los aislamientos de HSVd seleccionados vs las secuencias reportadas de cada subgrupo.

Según estos porcentajes, los aislamientos seleccionados corresponderían al grupo CVd-IIa que no genera caquexia en cítricos. Con respecto a los cambios mencionados en la Figura 37, se ubican en la región variable (V) de la estructura secundaria del viroide (Figura 36), aproximadamente en el nucleótido 110 del genoma. En la Figura 38 se muestra la predicción de estructura secundaria para HSVd de M29, M33, M39 y M48, y para las secuencias reportadas de CVd-IIa y IIb. Sólo se muestra la región de los cambios entre las dos variantes antes mencionadas.

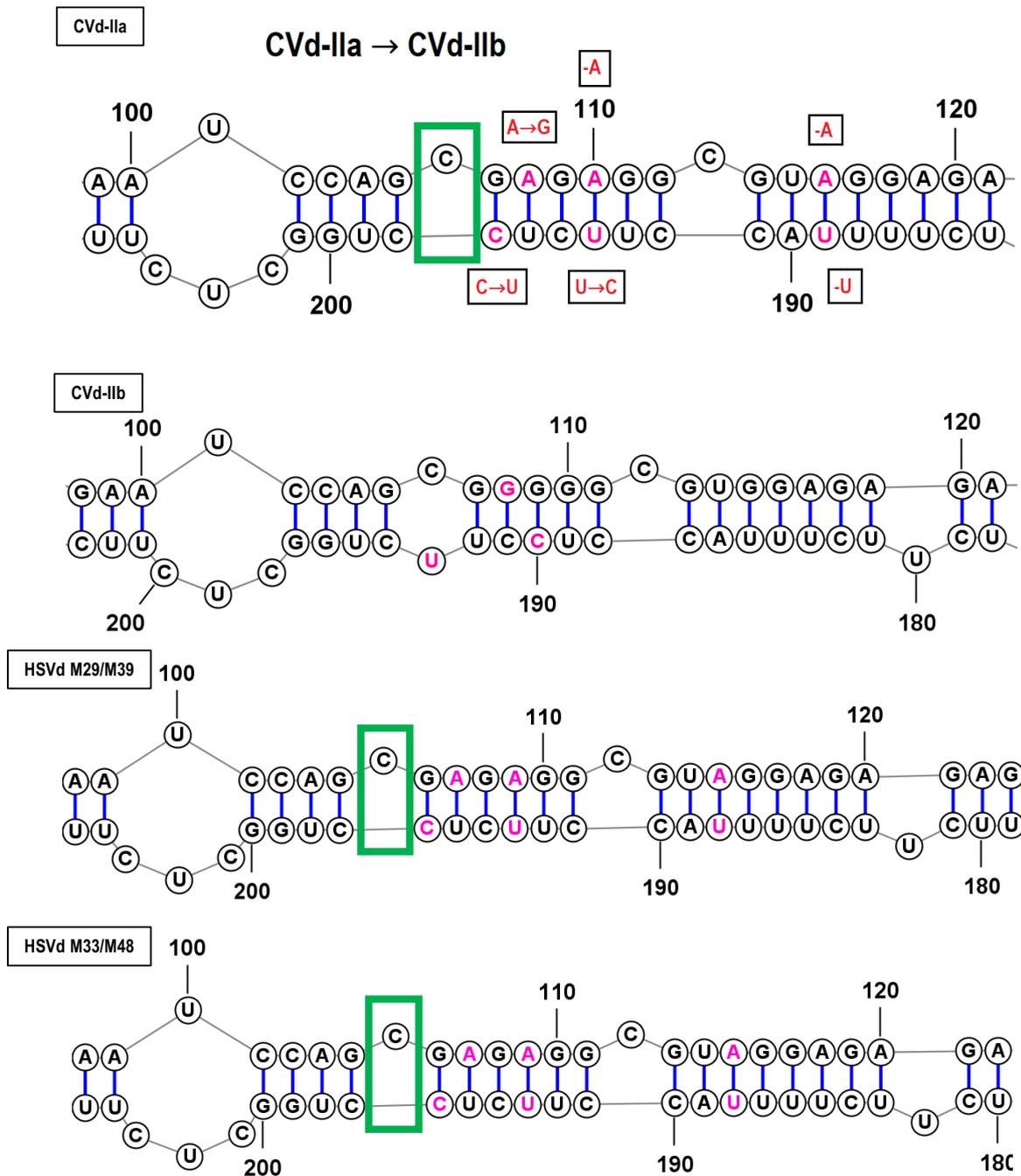


Figura 38: Estructura secundaria de las secuencias reportadas y de los aislamientos en estudio en la región asociada a la discriminación entre variantes CVd-IIa (AF213503.1) o b (AF213501) las cuales generan o no caquexia. Se marcaron con fucsia los 6 cambios reportados, y en la imagen de CVd-IIa se marcan en rojo los cambios entre a → b. En cajas verdes se marcan diferencias en la estructura secundaria.

Existe una estructura en forma de bucle que incluye el nt 105 que difiere entre las variantes CVd-IIa y CVd-IIb. Los aislamientos del presente trabajo comparten la estructura de esa región con la variante CVd-IIa de no caquexia, coincidiendo con la identidad de la secuencia en la región caracterizada por Reanwarakorn y Semancik (1998).

Además de comparar las estructuras, se realizó un alineamiento entre la secuencia de CVd-Ila (AF213503.1) y las cuatro de este trabajo (resultados no mostrados), y se vio solamente diferencias en el nucleótido 26 donde la secuencia CVd-Ila tiene una inserción con respecto a las otras cuatro además de los tres nucleótidos del CCR en los que se diferencian M33/M48 (igual a CVd-Ila), de M29/M39 (Figura 36). El último nucleótido de M39 también difiere de los demás aislamientos. Los cambios encontrados son pocos, menos que para los aislamientos de CEVd, lo que nos lleva a hipotetizar que HSVd se encuentra bastante conservado en cítricos en la región geográfica estudiada.

Dentro de la caracterización molecular de los aislamientos de HSVd, en esta tesis se llevaron a cabo algunos estudios filogenéticos para analizar las posibles asociaciones con diferentes ubicaciones geográficas y entre aislamientos que producen o no enfermedad. Se utilizaron una serie de secuencias depositadas en GenBank además de las secuencias reportadas de CVd-Ila/b/c y varias depositadas en GenBank además de las secuencias reportadas de CVd-Ila/b/c (AF213503 y AF213501.1 ambas proveniente de España, y AF131250 proveniente de Estados Unidos, respectivamente). Para estos análisis se utilizó el software MEGA versión 11.0.13. El método estadístico utilizado para crear los árboles fue el de *Neighbor-joining*. La distancia entre nucleótidos fue estimada por Jukes y Cantor's (Figura 39).

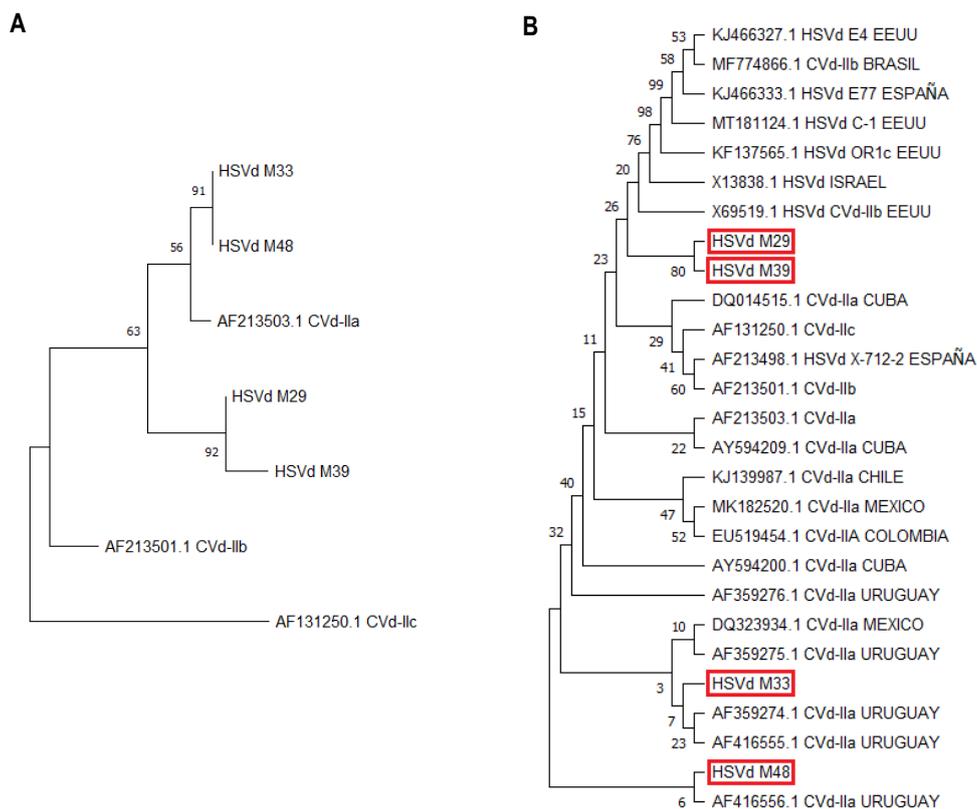


Figura 39: Análisis filogenético de los aislamientos seleccionados por el método *Neighbor-joining*. A) Árbol filogenético construido con Mega 11.0.13 a partir de las secuencias nucleotídicas de los aislamientos de M29, M33, M39, M48 y las secuencias de CVd-Ila/Ilb/Ilc reportadas que provienen de aislamientos de España (Ila y Ilb), y de Estados Unidos (Ilc). B) Árbol filogenético construido con las secuencias M29, M33, M39, M48 y secuencias representativas de diferentes países de América Latina y Estados Unidos, España e Israel, cargadas en el GenBank. La historia evolutiva se infirió con el método Bootstrap y el soporte de ramas se realizó con el método de bootstrapping (10000 réplicas). Los números en los nodos indican el porcentaje del test Bootstrap.

Los análisis filogenéticos confirman asociaciones más cercanas entre los aislamientos del presente trabajo con la secuencia reportada para el grupo CVd-Ila (no caquexia), alejándose de las secuencias de CVd-IIb y CVd-IIc. En el segundo árbol (Figura 39 B), se compararon las secuencias de los aislamientos del presente trabajo con secuencias de otros países de América Latina y de los países con Bancos de Germoplasma de los cuales Argentina puede ingresar material vegetal (Estados Unidos, España e Israel). Se incluyeron varias secuencias provenientes de Uruguay ya que presentaban bastantes diferencias entre ellas. Según el árbol resultante, podemos ver que las secuencias de M29 y M39 quedan más alejadas de la secuencia de CVd-Ila, mientras que M33 y M48 se agrupan con secuencias de Ila principalmente con las provenientes de Uruguay. El distanciamiento de M29/M39 de la secuencia reportada de CVd-Ila seguramente se debe a los cambios que presentan ambas en el CCR, los cuales las diferencian de M33/M48, y a la identidad que comparten en dicha secuencia con CVd-IIc. Con respecto al origen de las secuencias, como se mencionó las M33 y M48 se acercan a las secuencias de Uruguay, mientras que la M29 y M39 se asocian a un aislamiento proveniente de Estados Unidos.

3.C. Caracterización biológica de aislamientos de HSVd, mediante observación de sintomatología y acumulación en plantas de pepino.

Para el estudio individual de cada viroide y para evaluar la severidad de los síntomas que causa, se planteó la inoculación de un hospedante alternativo que permita ver diferencias sutiles en sintomatología. Para el caso del viroide HSVd se decidió utilizar pepino ya que se ha reportado que es hospedante sintomático y que es un sistema apropiado para el estudio del comportamiento de diferentes aislamientos. Los síntomas reportados en pepino son arrugamiento de hojas, epinastia, y retraso de crecimiento (Sasaki y Shikata, 1977 a y b; Marquez-Molins *et al.*, 2021).

En experimentos preliminares a los que se presentarán en este apartado, se ajustaron las condiciones de crecimiento de los plantines de pepino, incluyendo las condiciones de luz y temperatura, y el momento y forma de inoculación (Duran-Vila *et al.*, 1988b). Además, estos ensayos preliminares nos permitieron familiarizarnos con la sintomatología que causa HSVd en pepino (Figura 40).

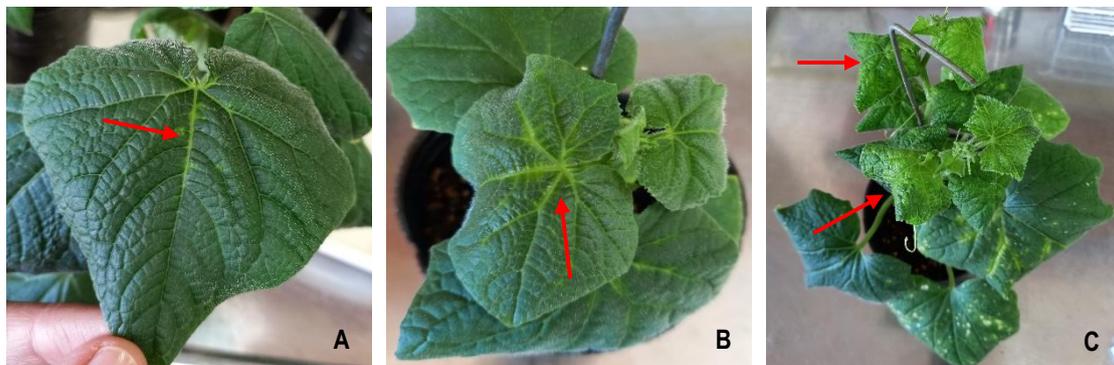


Figura 40: Síntomas observados en pepinos infectados con aislamiento de HSVd proveniente del banco de INTA EEA Concordia durante los ensayos preliminares. Clorosis en nervadura en estadio inicial (A) y avanzado (B). Reducción del tamaño de las hojas, retraso del crecimiento, arrugamiento y epinastia en hojas (planta de 45 días post inoculación (dpi)) (C).

Las muestras elegidas para este estudio fueron la M33 y M39 ya que fue posible aislar al viroide individual y obtener la secuencia de HSVd. De esta manera sería posible analizar las correlaciones entre severidad de síntomas y determinantes de secuencia. Para este ensayo se decidió inocular cuatro plantines de pepino por muestra con extractos provenientes del protocolo de recuperación de bandas de viroides desde sPAGE. Los plantines de pepino fueron inoculados apenas abrieron sus cotiledones, previo al desarrollo de sus primeras hojas verdaderas. Se realizaron 12 pinchazos embebiendo una aguja en el extracto y pinchando a lo largo del hipocótilo, y luego se inoculó cada cotiledón con ayuda de carborundum, lo que genera pequeñas raspaduras que favorecen el ingreso del viroide (Figura 41). Las plantas fueron mantenidas en incubadora a 32°C, con un fotoperiodo de 16hs luz y 8hs oscuridad, durante 6 meses.



Figura 41: Plantín de pepino en estado de cotiledón, con el agregado de carborundum previo a la inoculación con HSVd.

A los 34 días post inoculación, se realizó la evaluación visual en busca de síntomas (Figura 42) y días posteriores se realizó el diagnóstico por RT-PCR (45dpi). Si bien no fue posible visualizar sintomatología de arrugamiento de hojas o clorosis como se observó en los ensayos preliminares con el aislamiento del banco de testigos, se registraron las alturas de los plantines en busca de evaluar estadísticamente el retraso en el crecimiento de las plantas inoculadas. En la Tabla 14 se detallan las alturas de cada plantín y los resultados de las RT-PCR para las sucesivas evaluaciones, indicándose como detectable (d), o no detectable (nd). Se utilizó como control positivo un aislamiento del banco de testigos cedido por investigadores de EEA Obispo Colombres (T(+) 074). Dicho aislamiento proviene de lima Tahití (*Citrus × latifolia*) en la provincia de Tucumán, y fue secuenciado constatándose que pertenece a la variante HSVd-IIc (datos no mostrados), por lo que generaría caquexia. Las plantas de pepino inoculadas se evaluaron por RT-PCR a los 45, 79, 118, 150 y 193 dpi.

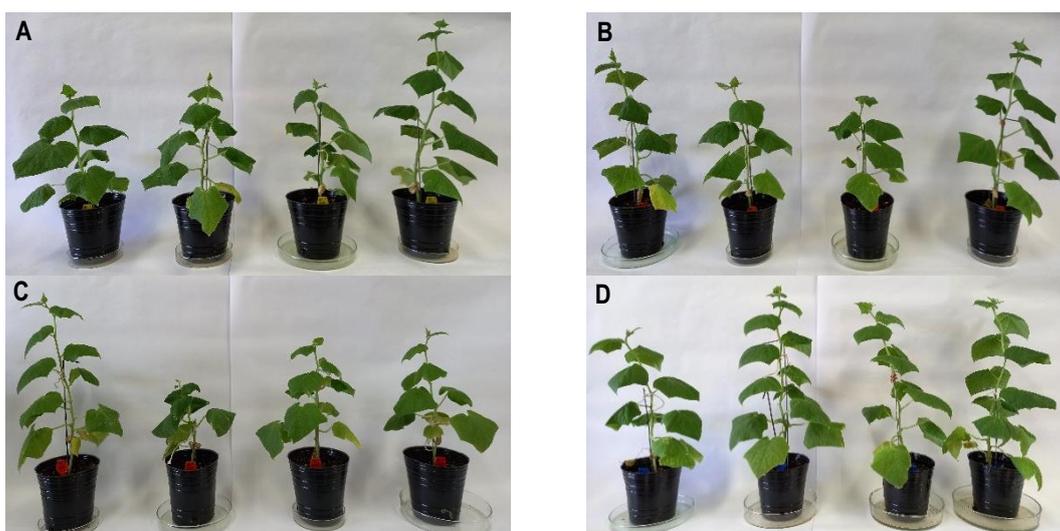


Figura 42: Plantines de pepino (1 al 4) inoculados con aislados de HSVd provenientes de las muestras: A) M33; B) M39, C) T(+) 074 y D) control (-) sin inocular a los 34 dpi.

Plantín	Muestra	Altura a los 34 dpi (cm) 21.04.2023	Resultado RT-PCR*	Nº de detecciones**
1	M33	33	d	1/5
2		35,5	d	2/5
3		34	d	2/5
4		45	d	1/5
5	M39	41	d	1/5
6		35	d	3/5
7		31,5	d	1/5
8		42	d	1/5
9	T(+) 074	43	nd	0/5
10		27	d	2/2
11		33	d	1/5
12		34,5	d	1/5
15	Control (-), sin inoculación	39	nd	0/5
16		48	nd	0/5
17		47	nd	0/5
18		48	nd	0/5

Tabla 14: Altura de los plantines de pepino inoculados con aislamientos de HSVd de las muestras M33 y M39, y detección por RT-PCR.

*d: detectable; nd: no detectable

**se realizó determinación por RT-PCR en cinco tiempos, se muestra el número de veces que dio resultado positivo.

El nivel de acumulación del HSVd en plantas de pepino inoculadas con muestras de los aislamientos extraídos desde el gel, en estudios en este trabajo, no fue suficiente para que el viroide pudiera ser detectado en todas las determinaciones que se realizaron a lo largo del ensayo, y esta podría ser la causa por la cual no se visualizó expresión de sintomatología foliar característica de la infección por HSVd. Si bien el fenotipo de disminución de crecimiento es evidente en la primera observación (Figura 42) y es significativo en los plantines inoculados con los aislamientos de las muestras M33 y M39 respecto a los controles sin inocular (Figura 43), creemos que la cantidad de viroide inoculado no fue suficiente para una buena replicación del mismo en la planta hospedante.

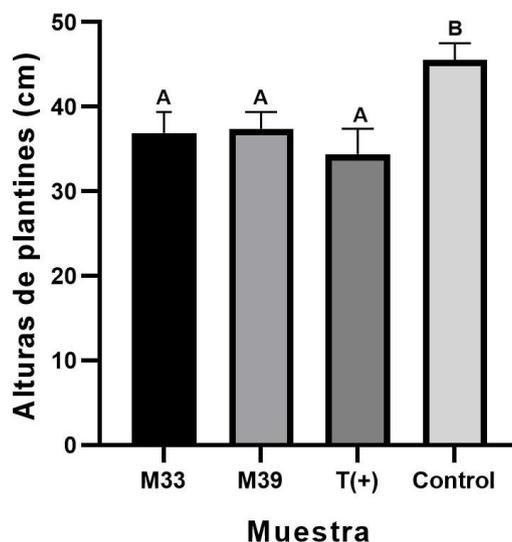


Figura 43: Alturas promedio de los plantines de pepino a los 34 dpi inoculados con HSVd aislado de las muestras M33 y M39. Además, se presenta las alturas registradas para el control positivo (T (+) 074) y negativo (sin inoculación). Se realizó un test *t student* comparando las muestras inoculadas con el control sin inocular revelando diferencias significativas (M33 vs control p valor=0,0495; M39 vs

control p valor=0,0496; T(+) vs control p valor=0,0306). Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras.

El plantín 10 que corresponde al T(+) 074 expresó síntomas severos y se llegó a realizarle dos determinaciones por RT-PCR porque luego murió por la infección causada por HSVd. Los síntomas observados fueron retraso del crecimiento, epinastia y arrugamiento de hoja o dobladura del borde hacia abajo (Figura 44). La severidad de la sintomatología observada en este plantín de pepino correlacionaría con la clasificación de este aislamiento según su determinante de secuencia en el grupo HSVd-IIc que causa caquexia en cítricos.

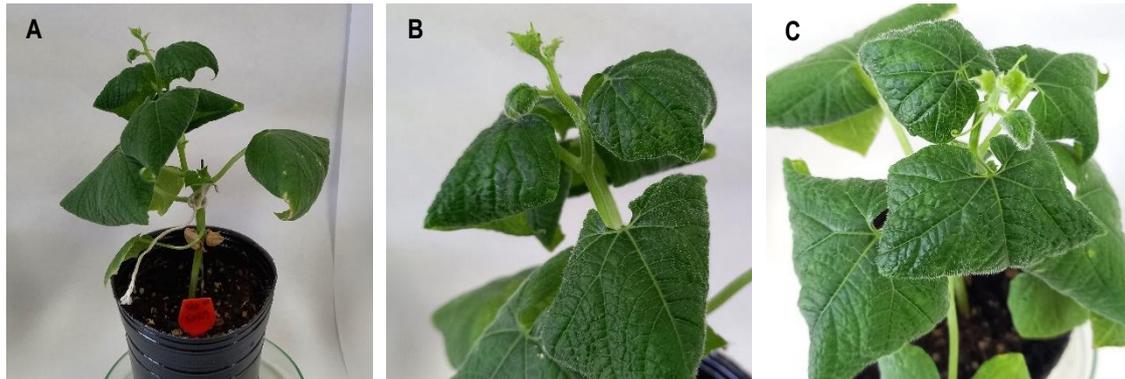


Figura 44: Síntomas observados en el plantín 10 inoculado con el testigo T(+) 074. A) Retraso del crecimiento. B) y C) Epinastia, dobladura y arrugamiento de hojas.

DISCUSIÓN

Se logró obtener las secuencias nucleotídicas completas de cuatro aislamientos de HSVd derivados de muestras colectadas a campo. Con las secuencias obtenidas se logró identificar y caracterizar los aislamientos, permitiéndonos clasificarlos como pertenecientes a la variante HSVd-IIa según lo reportado por Reanwarakorn y Semancik (1998). Estos formarían parte del grupo de aislamientos leves que no causan caquexia en cítricos y no se identificaron variantes que generen la enfermedad en la región citrícola del Río Uruguay. No se descarta que las variantes que causan la enfermedad estén presentes en la zona porque lo están en el país. El aislamiento utilizado como control, proveniente de la provincia de Tucumán, corresponde a CVd-IIc y causa caquexia por lo que estos aislamientos están presentes en las regiones citrícolas de Argentina. Es probable que las variantes que generan enfermedad estén menos representadas en la región citrícola del Río Uruguay donde se tomaron las muestras para este trabajo de tesis. La información sobre caquexia en Argentina es muy escasa, por ende, se desconoce su distribución en el territorio. Existen informes de la década de 1950 que reportaban presencia de huecos en el pie debajo de la corteza en plantas cítricas, alcanzando niveles del 50% de afectación, pero sin poder asociar dicho síntoma a un patógeno conocido (DuCharme y Knorr, 1954). Al momento no se conoce el porcentaje de aparición ni de distribución de cada una de las variantes de HSVd en Argentina.

Las secuencias estudiadas en el presente trabajo se asocian mayoritariamente a las provenientes de Uruguay para M33 y M48, y a las de Estados Unidos para M29 y M39. En el caso de Uruguay es probable que se deba no sólo a la cercanía del país, sino también por compartir frontera lo que posibilita el paso de material vegetal de cítricos entre los países. Con respecto a Estados Unidos es posible que mucho del material vegetal utilizado provenga de dicho país por su trayectoria en citricultura y en la generación de nuevas variedades comerciales.

Del análisis de las estructuras secundarias que adoptan las secuencias de las muestras M33/M48 y M29/M39, no se evidencian cambios significativos. Los cambios nucleotídicos entre las secuencias se localizan en el dominio central, específicamente en los nucleótidos 208, 209 y 210, pero no modifican el CCR. Y entre M29 y M39 hay un cambio en el nucleótido 302 que se ubica en el dominio terminal izquierdo (T_L). Los tres cambios en el CCR han sido previamente reportados por otros investigadores, aunque no han sido asociados a algún motivo o generación de síntomas (Palacio-Bielsa *et al.*, 2004). Con respecto a la región determinante para causar o no caquexia, no se observan modificaciones entre ambas secuencias ni con respecto a la secuencia reportada de CVd-IIa (AF213503.1). Sin embargo, se observó un cambio seguido de una deleción en los nucleótidos 26 y 27 con respecto a CVd-IIa, lo que provoca una alteración en la estructura del viroide en el *loop* 4 de la estructura secundaria completa (entre los nucleótidos 20-30) (ver la numeración de los *loops* en el ANEXO IV). No hay informes que lo asocien a patogenicidad, y al igual que antes, es un cambio que otros investigadores han encontrado en sus secuencias, tanto en variantes que generan caquexia como las que no (Reanwarakorn y Semancik, 1999 a/b; Palacio-Bielsa *et al.*, 2004). En la estructura secundaria de HSVd de la muestra M33, sólo se encontraron diferencias en el *loop* 4 con respecto a CVd-IIa; sin embargo, la estructura de la muestra M39 presentó dos cambios más en los *loops* 18 y 19 de la estructura secundaria completa

(entre los nucleótidos 90 y 100) (ver ANEXO IV), como resultado del cambio localizado en el dominio central en los nucleótidos 208-209 y 210, donde pasa de GAG a CGA, y viceversa. Al parecer, por los resultados obtenidos, estas variaciones no afectarían la patogenicidad del viroide.

A continuación, se presenta una tabla con resultados obtenidos para las muestras mencionadas en las distintas etapas (Tabla 15).

Muestra	Síntomas en naranjo a campo	Síntomas en cidra Etrog*	Altura de plantines de pepino (cm)**	Presencia de CEVd/CDVd	Secuencia
M33	Enanismo moderado, descortezado severo en el pie, y presencia moderada de huecos y acumulación goma debajo de la corteza.	Severo	36,9cm	Si	CVd-IIa
M39	Sin enanismo, presencia leve de huecos y acumulación goma debajo de la corteza, protuberancias leves en el pie, pero sólo de un lateral.	Leve	37,4cm	No	CVd-IIa

Tabla 15: resumen de resultados obtenidos en las distintas evaluaciones en las muestras M33 y M39.

*promedio de los síntomas visualizados en los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con la muestra de campo.

**promedio de las alturas de las plantas de pepino inoculadas con el aislamiento de HSVd correspondiente a cada muestra.

La muestra M33 presentaba síntomas más severos en naranjo a campo y también en cidra Etrog en comparación con la M39, aunque hay que remarcar que la misma presenta una infección triple junto a CEVd y CDVd, y la M39 sólo infección doble con CDVd. La diferencia de severidad observada podría explicarse por la presencia de estas coinfecciones con CEVd y CDVd en la M33. Es conocido que la presencia de otros viroides puede causar sinergismo en la manifestación de síntomas, como podría ser este caso, o como mencionamos en el capítulo 2 que los síntomas podrían depender de las variantes más o menos presentes en dichas muestras. Por otro lado, ambas, ya asiladas, produjeron una reducción similar en el crecimiento de los plantines de pepino y se clasifican por sus determinantes de secuencia como CVd-IIa o no caquexia.

Como no se encontraron diferentes variantes de HSVd en la región, no se pudo obtener conclusiones con respecto a las variantes presentes y la geografía del lugar.

Como perspectiva a futuro, se planea volver a repetir el ensayo con pepinos, partiendo de un inóculo de ARN total de pepinos infectados con cada aislamiento, en lugar de utilizar las extracciones de gel. Esto se llevará a cabo para todas las muestras provenientes de cidra, con la finalidad de asegurar un buen nivel de acumulación de los viroides en las plantas de pepino y caracterizar así la sintomatología y acumulación del viroide luego de la infección.

Capítulo 4

Citrus dwarfing viroid

INTRODUCCIÓN

El viroide del enanismo de los cítricos o *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), anteriormente llamado como CVd-III, es una especie que está conformada por tres variantes, siendo estas CVd-IIIa, CVd-IIIb y CVd-IIIc. La identidad de secuencia entre CVd-IIIa y CVd-IIIb es de 95,95% con 11 cambios característicos entre ellos; mientras que la identidad de secuencia entre CVd-IIIc y CVd-IIIb es de 93,93% con 12 cambios característicos entre ambos. El análisis de varias secuencias reportadas en el mundo permitió conocer que posee un genoma muy conservado, siendo CVd-IIIb la variante más abundante, mientras que las del tipo CVd-IIIa son poco frecuentes. CDVd se halla ampliamente diseminado en las regiones cítricas del mundo, donde sus efectos pueden pasar inadvertidos ya que no produce síntomas específicos en las especies y variedades comerciales (Murcia, 2009; Serra, 2009). Además, como se mencionó antes, los cambios que provoca en las plantas infectadas, dependen de varios factores como la especie, variedad, portainjerto y edad de la planta al momento de la infección (Duran-Vila, 2004; Lavagi-Craddock *et al.*, 2022).

CDVd se ha estudiado para su aprovechamiento como agente de enanismo transmisible por injerto. Plantas de naranjo (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) propagados sobre el portainjerto trifoliado ((*C. trifoliata* (L.), sinónimo *Poncirus trifoliata* (L.)) presentan un retraso en el crecimiento inducido por la infección por CDVd, lo que provoca reducción de la copa del árbol (Lavagi-Craddock *et al.*, 2022). Resulta conveniente la obtención de árboles más pequeños ya que el volumen de la copa reducido puede facilitar las labores del cultivo, además este viroide no genera grandes efectos perjudiciales sobre el rendimiento y/o calidad de la fruta, y pequeñas diferencias en la producción pueden compensarse realizando plantaciones más densas (Murcia, 2009; Tessitori *et al.*, 2013).

4.A. Cuantificación de CDVd mediante RT-qPCR

Para el viroide CDVd, los resultados en porcentajes de infección son los mismos que los presentados para HSVd porque ambos viroides siempre fueron encontrados coexistiendo en mezclas. Del total de muestras recolectadas y analizadas, el 62.96% estaban infectadas por CDVd, asociado a HSVd, con la presencia o no de CEVd. Considerando sólo aquellas muestras que fueron positivas para CDVd, se lo encontró en un 41,2% de las plantas co-inoculando con CEVd y HSVd, y en un 52,8% junto a HSVd (Figura 45).

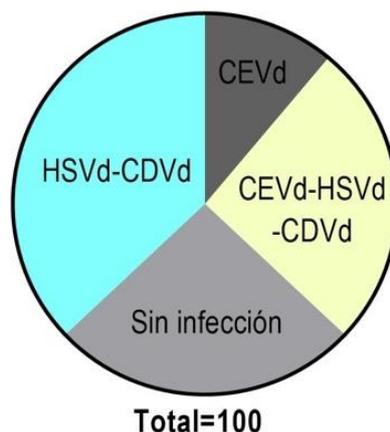


Figura 45: Porcentajes de aparición de CDVd en diferentes combinaciones en relación al total de plantas infectadas.

Las muestras de campo fueron inoculadas en cidra Etrog desde donde se realizaron los diagnósticos mediante *indexing* biológico, sPAGE y RT-qPCR. Como se mencionó en el capítulo 1, las técnicas tienen distintas especificidad y sensibilidad, pero coincidieron los resultados en determinar muestras positivas o negativas, ya que el *indexing* biológico sólo nos permite esto. Las metodologías que sí son específicas son SPAGE y RT-qPCR, las cuales coincidieron 100%.

A continuación, se presentan los resultados de la RT-qPCR obtenidos para las muestras de campo inoculadas en plantines de cidra Etrog que arrojaron resultados positivos para CDVd (Figura 46). Cada barra en el gráfico representa el promedio de cuantificación relativa obtenido a partir de los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo, y se muestra el error estándar medio (SEM) de cada conjunto. Las dispersiones observadas se deben a que son promedios de cuatro réplicas biológicas, y dado que se trata de plantas distintas, no siempre presentan un comportamiento similar.

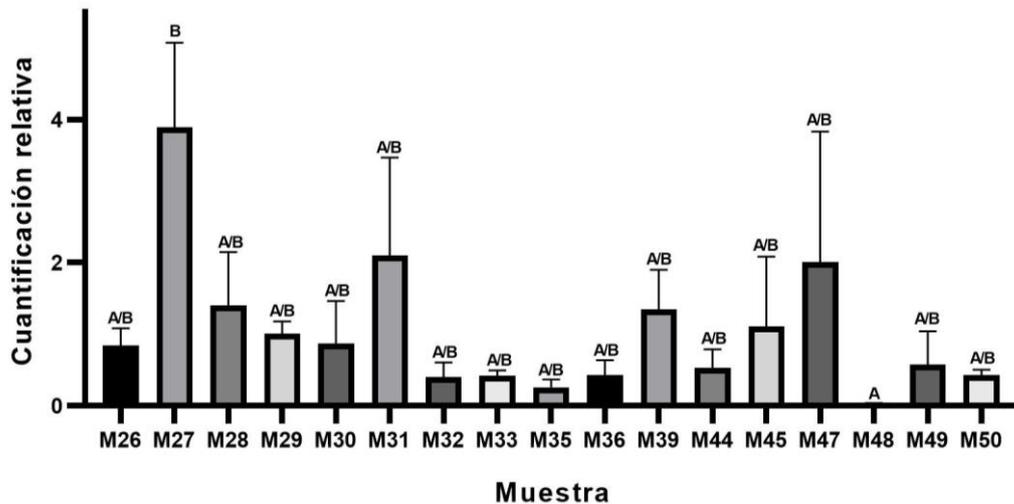


Figura 46: Cuantificación relativa mediante RT-qPCR de CDVd en plantines de cidra Etrog. Se presenta el promedio de los valores obtenidos para los cuatro plantines de cidra Etrog inoculados con cada muestra de campo que resultaron positivos para CDVd. Los datos se normalizaron utilizando dos controles internos: los genes de ubiquitina y citocromo oxidasa. Para la cuantificación relativa se utilizó el método *Pfaffl*. Sobre cada barra se representa el error estándar de la media (SEM). Se realizó un test de ANOVA. Diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las muestras.

En cuanto a la acumulación de cada muestra, no pudimos dilucidar correlación con síntomas ni en campo ni en cidras, solamente decir que tres de las muestras que más acumularon CDVd según la cuantificación por RT-qPCR, que sería las muestras M27, M31 y M47, mostraban síntomas leves a moderados en cidra Etrog, y que en M47 eran un poco más intensos, pero en dicha muestra estaban en mezcla con CEVd, además de HSVd que siempre se los encontró juntos.

Para analizar si existían diferencias en la acumulación de CDVd en las diferentes muestras se realizó un test de ANOVA, dando como resultado que no hay diferencias significativas entre las distintas muestras (p valor= 0,0796), aunque dicho análisis ubica a la M27 y la M48 en grupos diferentes, siendo estas la que más acumula versus la que menos acumula, respectivamente.

4.B. Caracterización molecular de aislamientos obtenidos de CDVd mediante clonado, secuenciación y análisis filogenético.

Con el propósito de caracterizar molecularmente las poblaciones de CDVd en la región, se eligieron tres muestras. Los criterios de selección fueron el área geográfica a la cual pertenecían y la severidad de la sintomatología que se observó en la planta de campo cuando se tomaron las muestras, y en las plantas de cidra Etrog al año desde la inoculación. Las muestras elegidas fueron:

- La M33 que presenta síntomas severos extremos en cidra (al punto de que las plantas van a morir en cierto tiempo), pertenece al área del Departamento Concordia y se encuentra en mezcla con HSVd/CEVd.
- La M39 que presenta síntomas leves/moderados, pertenece al área del Departamento Federación y se encuentra sólo con HSVd.
- La M48 que presenta síntomas principalmente moderados, pertenece al área del Departamento Monte Caseros y se encuentra en mezcla con HSVd/CEVd.

La caracterización molecular de los aislamientos de CDVd se llevó a cabo mediante el clonado y secuenciación de amplicones de RT-PCR. Las amplificaciones se realizaron desde extractos de las cidras Etrog inoculadas con las muestras recolectadas en campo. Se secuenciaron un promedio de cinco clones por muestra de campo. Se obtuvo la secuencia consenso completa del viroide para cada muestra utilizando el software *EMBOSS Cons del EMBL's European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI). La Figura 47 muestra el alineamiento entre las tres secuencias consenso de M33 (PP588712), M39 (PP588713) y M48 (PP588714), y se resaltó los nucleótidos entre los cuales difieren.

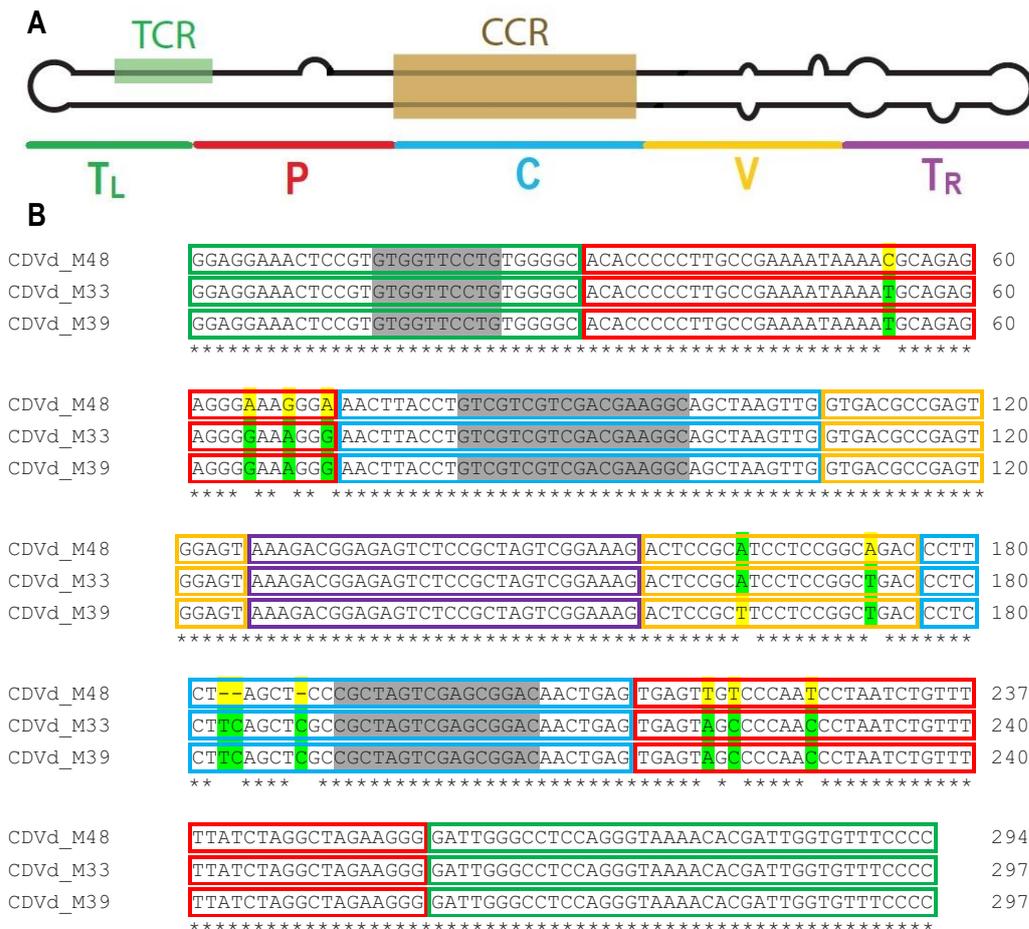


Figura 47: Alineamiento de las secuencias de CDVd provenientes de las tres muestras seleccionadas M33, M39 y M48. En el panel A se muestra la estructura secundaria del viroide con la ubicación de los dominios en distintos colores: terminal izquierdo (TL) verde, patogénico (P) rojo, central (C) celeste, variable (V) naranja y terminal derecho (TR) en violeta. En el panel B se muestra el alineamiento de secuencias consenso de las muestras M33, M39 y M48 realizado con CLUSTAL O, versión 1.2.4. Se resaltan en verde y amarillo los cambios de nucleótidos entre las secuencias, y con distintos colores la ubicación de los dominios al igual que el panel A. Además, se remarca con gris la ubicación de la región conservadas terminal (TCR) sobre el extremo 5', y la región central conservada (CCR) en el dominio C.

Al comparar las secuencias, se puede ver que M33 (297nt) y M39 (297nt) sólo difieren en el nucleótido 165 (A → T), y que ambas difieren de M48 (294nt) en un total de doce nucleótidos. Los cambios entre las secuencias se ubican en el dominio patogénico principalmente, seguido del dominio variable y el central.

CDVd se clasifica según la bibliografía en tres subclases CVd-III: a, b y c (Rakowski *et al.*, 1994; Semancik *et al.*, 1999; Murcia *et al.*, 2010) (Figura 48). En base a esta clasificación, se buscó identificar a qué grupo correspondían los aislamientos de este trabajo, para lo cual se alineó las secuencias consenso para cada muestra con una secuencia conocida de cada subgrupo detalladas a continuación (se incluyen números de acceso en *GenBank* y tamaño):

- ▶ CVd-IIIa: S76452.1 (297nt)
- ▶ CVd-IIIb: AF184147.1 (294nt)
- ▶ CVd-IIIc: AF184149.1 (291nt)

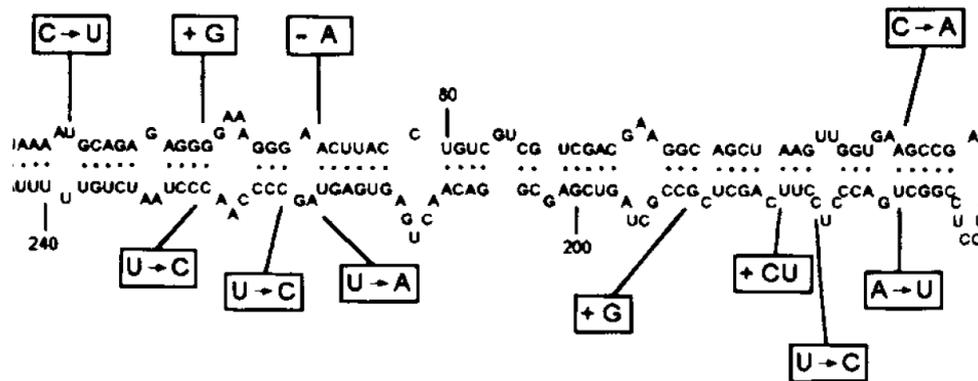


Figura 48: Secuencia y estructura de los grupos CVd-IIIa y CVd-IIIb según Rakowski *et al.*, 1994. Los cambios que marcan las cajas corresponden al paso de IIIb→IIIa. Los signos + corresponden a inserciones, mientras que el signo - es una delección.

De los alineamientos con las secuencias conocidas de cada sub-grupo se evidenció que M33 y M39 en comparación con la secuencia de CVd-IIIa (S76452.1) sólo difieren en 1 nucleótido del dominio variable para M33, y dos nucleótidos para M39, ambos también en el dominio variable (datos no mostrados). Los porcentajes de identidad fueron de 99.66% y 99.33%, respectivamente. Mientras la M48 se alineó con la secuencia reportada del grupo CVd-IIIb (AF184147.1) y se encontró que ambas secuencias eran 100% idénticas (datos no mostrados). De manera similar como ocurrió con HSVd al comparar las secuencias con las reportadas de cada grupo, CDVd parecería estar bastante conservado en nuestra región. En la Tabla 16 se detalla los porcentajes de identidad obtenidos para los distintos alineamientos que se realizaron utilizando BLASTn.

Muestra	Identidad de secuencia (%)		
	CVd-IIIa (S76452.1)	CVd-IIIb (AF184147.1)	CVd-IIIc (AF184149.1)
33	99,66	96,31	94,95
39	99,33	95,97	94,61
48	95,97	100	95,59

Tabla 16: porcentajes de identidad de aislamientos de CDVd vs las secuencias reportadas.

Además de realizar el alineamiento y ver los porcentajes de identidad, se predijeron las estructuras secundarias de los aislamientos y de las secuencias de reportadas para ambos grupos, CVd-IIIa (S76452.1) y CVd-IIIb (AF184147.1). Para esto, se utilizó el software online *RNAstructure* Web Server versión 6.0.1 (Reuter y Mathews, 2010). Analizando las conformaciones, podemos concluir que la ubicación de los cambios en la secuencia principalmente se localiza en el dominio patogénico (P) y variable (V). En referencia a la estructura secundaria, se puede observar la desaparición de un pequeño *loop* ubicado en la región del nucleótido 70 en la reportada CVd-IIIb y también en la M48, mientras que CVd-IIIa, M33 y M39 lo poseen (Figura 49).

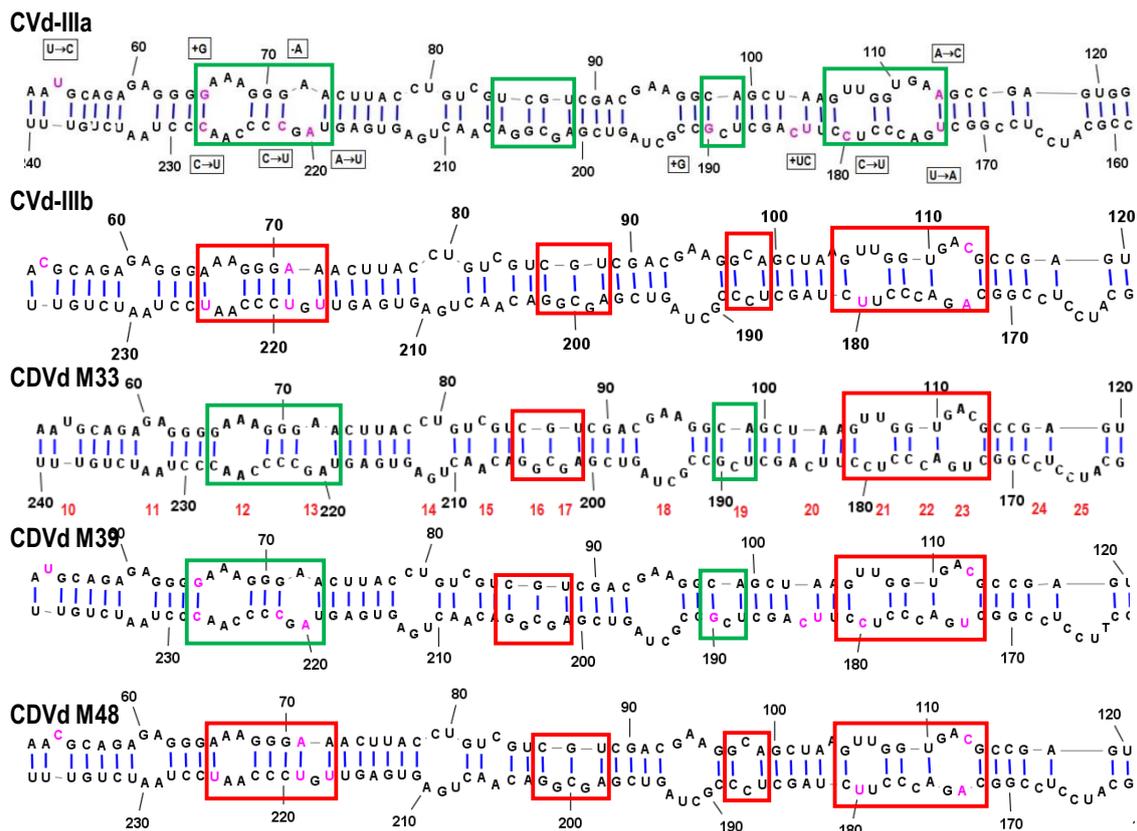


Figura 49: Estructura secundaria de la región del genoma asociada a la variación entre una variante a y una b, tanto para las secuencias reportadas como para los aislamientos en estudio. Se marcaron con fucsia los 11 cambios reportados, y en la imagen de CVd-IIIa se encuadran los cambios entre a → b. En cajas verdes y rojas se marcan diferencias en la estructura secundaria a la altura de los *loops* 12/13, 16/17, 19 y 21/22/23, respectivamente. En números rojos se marcan los números de cada *loop* en relación a la estructura completa del viroide.

Se puede afirmar que los aislamientos M33 y M39 se asocian a la variante IIIa, mientras que el aislamiento M48 pertenecería al grupo IIIb. En cuanto a la conformación secundaria que adoptan las secuencias de los aislamientos de este trabajo, se observa que tanto M33 como M39 comparten mayormente la estructura con IIIa y algunos *loops* con IIIb (ver Figura 49). El único nucleótido que varía entre M33 y M39 no afecta a la estructura secundaria. Los *loops* donde tanto M33 y M39 comparten estructura con IIIa son los 12/13 y 19, mientras que los que presentan diferencias son los *loops* 16/17 y 21/22/23, los cuales comparten estructura con IIIb. Los *loops* 16 y 17 en IIIb se unen por una secuencia de un par de nucleótidos, mientras que en CVd-IIIa se unen por dos pares de nucleótidos. El *loop* 22 solo se encuentra presente en CVd-IIIb, pero no se encuentra en las secuencias reportadas de IIIa y IIIc, lo que resulta en que ambos grupos presenten un *loop* menos en total. Sin embargo, el *loop* 22 si está presente en los tres aislamientos de este trabajo. El *loop* 23 está conformado por cinco nucleótidos no apareados tanto en IIIb y IIIc como en los tres aislamientos, mientras que en CVd-IIIa son seis nucleótidos no apareados, lo que da lugar a un *loop* de mayor tamaño. Con respecto a la M48 todos los *loops* mencionados son iguales a CVd-IIIb.

Para analizar divergencias se sometieron las secuencias de los aislamientos de este trabajo y varias depositadas en *GenBank*, a estudios filogenéticos utilizando el software MEGA versión 11.0.13. El método estadístico utilizado para crear los árboles fue el Neighbor-joining. La distancia entre nucleótidos fue estimada por Jukes y Cantor's.

Los análisis filogenéticos confirman las asociaciones entre los aislamientos M33 y M39, y la variante IIIa; mientras que el aislamiento M48 se asocia al IIIb (Figura 50 A). En el segundo árbol (Figura 50 B), se compararon las secuencias de los aislamientos de este trabajo con secuencias de otros países de América Latina y de países con Bancos de Germoplasma de los cuales Argentina puede ingresar material vegetal (Estados Unidos, España e Israel). Los aislamientos caracterizados en esta tesis se separaron en dos grandes clústeres. Las muestras M33 y M39 se asociaron más a secuencias de Estados Unidos, España, Uruguay e Israel, mientras que la muestra M48 se agrupó con secuencias provenientes de diversos países siendo difícil evaluar la procedencia. Se confirmó la agrupación entre secuencias del grupo IIIa y IIIb, incluidos los aislamientos de este trabajo con secuencias de IIIb de los demás países, y con las secuencias de esta variante reportadas en la provincia de Tucumán. Las secuencias M33 y M39 se ubican cerca de la reportada en Uruguay, pero cabe aclarar que es la única secuencia IIIa reportada para países de América Latina.

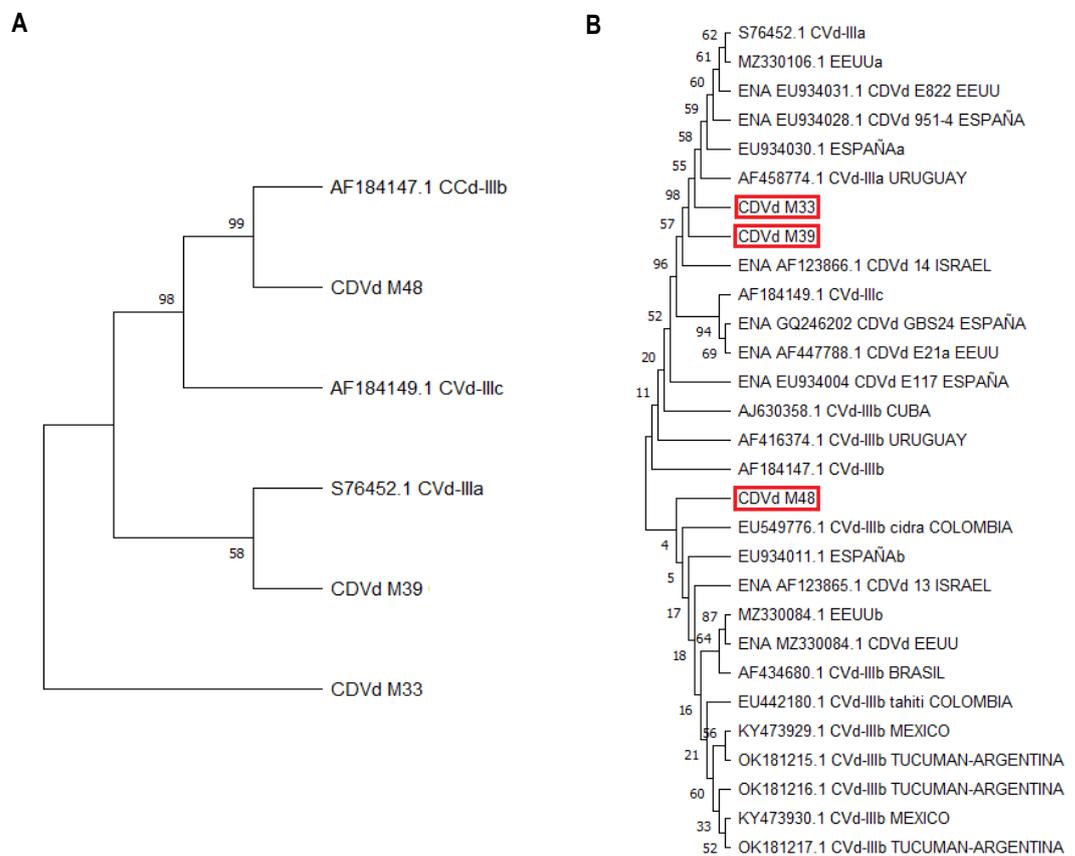


Figura 50: Análisis filogenético de los aislamientos seleccionados por el método Neighbor-joining. A) Árbol filogenético construido con Mega 11.0.13 a partir de las secuencias nucleotídicas de los aislamientos de M33, M39, M48 y tres aislamientos reportados como IIIa- b y c (Rakowski *et al.*, 1994; Semancik *et al.*, 1997); (B) Árbol filogenético construido con las secuencias M33, M39, M48 y secuencias representativas de diferentes países de América Latina y Estados Unidos, España e Israel, cargadas en el GenBank. La historia evolutiva se infirió con el método Bootstrap y el soporte de ramas se realizó con el método de bootstrapping (10000 réplicas). Los números en los nodos indican el porcentaje del test Bootstrap. Con marcos rojos se señalan los aislamientos de este trabajo.

4.C. Caracterización biológica de aislamientos de CDVd, mediante observación de sintomatología y acumulación en plantas de cidra Etrog.

Para el estudio individual de este viroide, para evaluar la severidad de los síntomas que causa y su asociación a los determinantes de secuencia analizados en la sección anterior, se planteó la reinoculación de los viroides individuales aislados desde gel, en plantines de cidra Etrog de manera de analizar su comportamiento independiente del efecto que pudiera tener su asociación con otros viroides en las mezclas. Para CDVd no se conocen o no se ha reportado otro hospedante fuera de los cítricos. En cidra está reportado que CDVd causa arrugamiento del peciolo y necrosis acompañada de la caída de hojas por dicha necrosis, y puede ocasionar epinastia (Serra, 2009; Murcia, 2009; Tessitori, 2017).

Las muestras elegidas para este estudio fueron la M33 y M39, descritas en la sección anterior ya que no fue posible aislar CDVd de la muestra M48. Ambas pertenecen a la variante IIIa con un nucleótido distinto en su secuencia. Para este ensayo se decidió inocular seis plantines de cidra Etrog por muestra de extracto proveniente del protocolo de recuperación de bandas de viroides desde sPAGE. A cada plantín, se le realizó cuatro cortes en el tallo utilizando una navaja, y se le colocó extracto en cada corte. Las plantas fueron mantenidas en invernáculo a 28-32°C hasta su evaluación.

Aproximadamente cuatro meses después de la inoculación, se realizó la evaluación visual en busca de síntomas y el diagnóstico por RT-qPCR. En la Tabla 17 y Figuras de 51 a 53 se muestran los síntomas observados y características de las plantas. La tasa de infección a partir de muestras de CDVd aisladas de gel no fue alta. La misma se estimó entre el 35 y el 50 %.

Plantín	Sintomatología	RT-qPCR
M33-1	Ep+, Ap++, Anc+++, Ans+, G++	+
M33-2	Sin síntomas	-
M33-3	Sin síntomas	-
M33-4	Ep+, Ap++, Anc++, Ans+, G++	+
M33-5	Ep+, Ap+++, Anc+++, Ans++, G++	+
M33-6	Sin síntomas	-
M39-1	Sin síntomas	-
M39-2	Ep+, Ap+++, Anc+++, Ans+++, G+	+
M39-3	Ep+, Ap+++, Anc+++, Ans+++, G+	+
M39-4	Sin síntomas	-
M39-5	Sin síntomas	-
M39-6	Sin síntomas	-
Control-1	Sin síntomas	-
Control-2	Sin síntomas	-
Control-3	Sin síntomas	-
Control-4	Sin síntomas	-
Control-5	Sin síntomas	-
Control-6	Sin síntomas	-

Tabla 17: Síntomas observados en los plantines de cidra Etrog inoculados con los aislamientos de CDVd desde las muestras M33 y M39. El control corresponde a plantas sin inocular.

Codificación de síntomas: Ep: epinastia; Ap: amarronamiento de peciolos; Anc: amarronamiento en nervadura central; Ans: amarronamiento en nervadura secundaria; G: acumulación de goma debajo de la corteza; Rc: retraso de crecimiento.

Clasificación de los síntomas: sin síntoma: -, leve: +, moderado: ++, severo: +++.



Figura 51: Cidras Etrog sin inoculación ni síntomas (A), inoculados con el aislamiento de CDVd de la M33 (B) y de M39 (C).

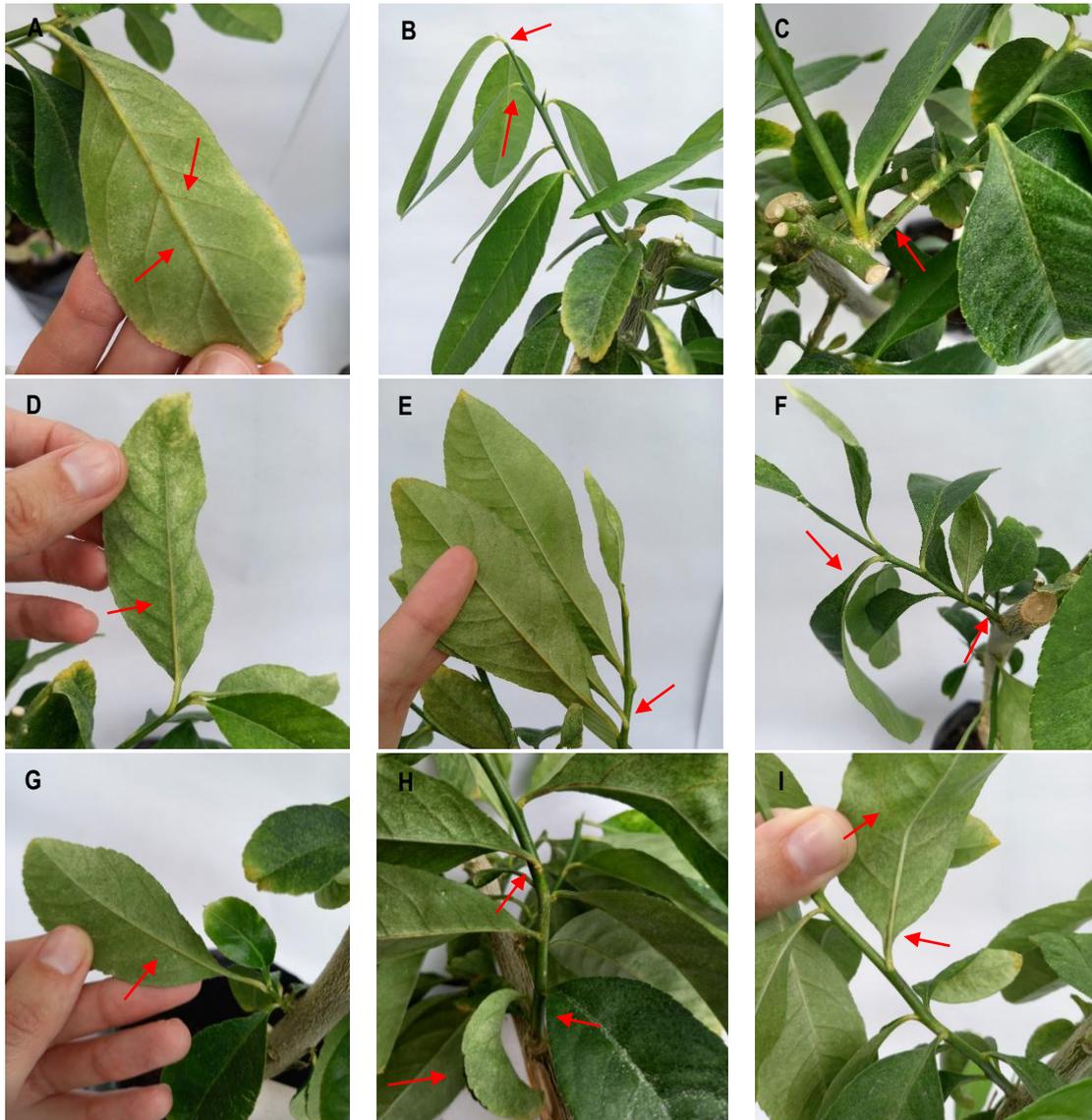


Figura 52: Síntomas observados en plantines inoculados con la muestra M33 de CDVd: **plantín 1** con amarronamiento de nervadura central y secundarias (A), epinastia y amarronamiento de peciolo (B) y acumulación de goma debajo de la corteza (C); **plantín 4** con amarronamiento nervadura central (D), amarronamiento de peciolo (E), epinastia y acumulación de goma debajo de la corteza (F); **plantín 5** con amarronamiento de nervadura central (G), amarronamiento de peciolo, epinastia y acumulación de goma debajo de la corteza (H), amarronamiento en nervaduras central y secundarias (I). Se señalan los síntomas mencionados con flechas rojas.

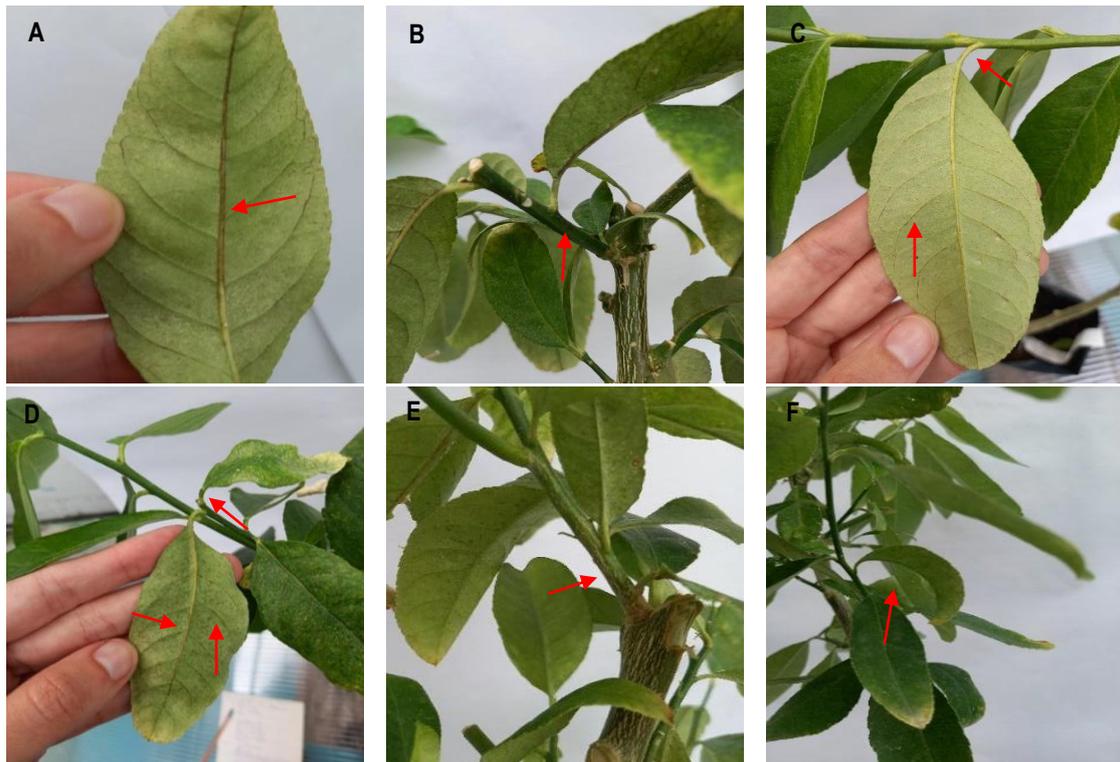


Figura 53: Síntomas observados en plantines inoculados con la muestra M39 de CDVd: **plantín 2** con amarronamiento de nervadura central (A), acumulación de goma debajo de la corteza (B) y, amarronamiento de peciolo y nervaduras secundarias (C); **plantín 3** presentando amarronamiento de nervadura central, secundarias y del peciolo (D), acumulación de goma debajo de la corteza (E) y epinastia (F). Se señalan los síntomas mencionados con flechas rojas.

Además de confirmar la infección con CDVd por RT-qPCR de todos los plantines de cidra Etrog, con o sin síntomas, se procedió a cuantificar los niveles de dicho viroide en ambas muestras evaluadas y así poder comparar los niveles de acumulación de los mismos. Para dicha cuantificación se utilizaron dos genes como controles internos de la planta: ubiquitina y COX. Los plantines controles negativos presentaron resultado negativo para la presencia de CDVd por RT-qPCR. La acumulación de CDVd por RT-qPCR se correlacionan en general con la severidad de los síntomas observados en cada plantín de cidra Etrog inoculadas con los viroides aislados. Si bien los plantines inoculados con la muestra M39 exhiben en promedio acumulaciones mayores existe alta dispersión en los datos. En el caso de los plantines de cidra Etrog originales inoculados con muestras de campo (previo al aislamiento por gel) la severidad estaría influenciada por la presencia de las mezclas de CDVd con los otros viroides, CEVd y HSVd (M33) o HSVd (M39), por eso es que la M33 presenta sintomatología más moderada en las cidras inoculadas con este viroide aislado.

Se realizó un análisis estadístico (*t de student*) para comparar las medias de la cuantificación relativa de cada aislamiento, y ver si presentaban diferencias significativas. Para el cálculo de las medias, se tuvieron en cuenta sólo las muestras que resultaron positivas para CDVd. El resultado obtenido, no arrojó diferencias significativas entre la acumulación de ambos aislamientos (p valor= 0.1185) (Figura 54).

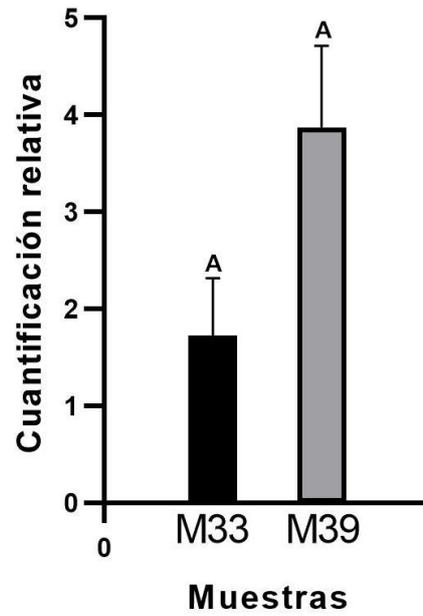


Figura 54: Acumulación de CDVd en plantines de cidra Etrog inoculados con los aislamientos provenientes de M33 y M39. Se normalizaron los datos utilizando dos controles internos: los genes de ubiquitina y citocromo oxidasa. Para la cuantificación relativa se utilizó el método *Pfaffl*. Sobre cada barra se representa el error estándar de la media (SEM). Se realizó un test *t de student*, pero no se vieron diferencias significativas.

DISCUSIÓN

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas completas de CDVd a partir de cuatro muestras amplificadas, clonadas y secuenciadas. Con las secuencias obtenidas se logró identificar y caracterizar los aislamientos, permitiéndonos clasificarlos dentro de las variantes reportadas como CVd-IIIa y CVd-IIIb. Las muestras M33 y M39 corresponderían al grupo CVd-IIIa, mientras que la M48 sería CVd-IIIb.

La comparación con otros aislamientos mediante el árbol de filogenia reveló dos grandes clústeres. Las muestras M33 y M39 se asociaron más a secuencias de Estados Unidos, España, Uruguay e Israel, mientras que la muestra M48 se agrupó a varios países siendo difícil asociar estos resultados a una posible procedencia.

Se inocularon los aislamientos de CDVd de las muestras M33 y M39 en cidra Etrog, con resultados de acumulación similares, correlacionándose con la alta identidad de secuencias y/o conservación de sus estructuras secundarias. La Tabla 18 resume los resultados obtenidos para el viroide CDVd desde la sintomatología de las plantas en campo hasta la evaluación de los aislamientos en cidra Etrog.

Muestra	Síntomas en naranjo a campo	Síntomas en cidra Etrog *	Cuantificación relativa en cidra Etrog ^{*/***/****}	Síntoma en cidra Etrog ^{**/**/****}	Cuantificación relativa en cidra Etrog ^{**/**/****}
M33	E++, D+++, H++ y Gp++	Severo (en mezcla con CEVd y HSVd)	0,43 (bajo)	Ep+, Ap++, Anc+++, Ans+, G++	1,73
M39	E-, H+, Gp+ P+	Leve/Moderado (en mezcla con HSVd)	1,35 (intermedio)	Ep+, Ap+++, Anc+++, Ans+++, G+	3,87

Tabla 18: Resumen de resultados obtenidos en las distintas evaluaciones en las muestras M33 y M39.

Codificación de síntomas: E: enanismo; D: descortezado del pie; P: protuberancias en el pie; Gp: acumulación de goma debajo de la corteza del pie; H: presencia de huecos debajo de la corteza en el pie; Ep: epinastia; Ap: amarronamiento de peciolo; Anc: amarronamiento en nervadura central; Ans: amarronamiento en nervadura secundaria; Rc: retraso de crecimiento; G: acumulación de goma debajo de la corteza.

Clasificación de los síntomas: leve: +, moderado: ++, severo: +++.

*CDVd en mezcla con HSVd y/o CEVd. ** CDVd aislado. ***se clasifica en baja-media-alta. ****promedio entre los plantines de cidra Etrog inoculados. *****promedio entre los plantines de cidra Etrog inoculados con el aislamiento de CDVd.

La muestra M33 muestra más severidad en sus síntomas a campo y en cidra Etrog (*indexing* biológico) en relación a la M39 (Tabla18). Dado que a nivel de secuencia sólo poseen un único cambio podría asociarse este comportamiento diferencial a la coinfección de CDVd con HSVd y CEVd en la muestra M33, manifestándose un fenómeno de sinergismo entre viroides. En la muestra M39 la coinfección se da sólo con HSVd no estando CEVd presente. Tanto los síntomas propios de CDVd como el posible sinergismo que podría presentar con las distintas combinaciones con HSVd o CEVd/HSVd, explicarían las diferencias en sintomatología observadas. Una vez aislado CDVd la sintomatología severa en cidra Etrog deja de verse y ambas muestras se comportan de manera muy similar (Tabla18).

En relación a las variantes caracterizadas de CDVd y la geografía del muestreo, podría haber una distribución desigual en la región, con variantes IIIa en la zona sur (M33 y M39) y IIIb en la zona norte de esta región citrícola (M48), aunque se debería analizar más muestras para corroborar esto, al igual que la ausencia de IIIc.

Como perspectiva a futuro, la variante de CDVd de la M48 corresponde a una CVd-IIIb, por esta razón, se proyecta realizar nuevos intentos para lograr aislarlo y caracterizarlo. Se pretende evaluar este aislado en cidra Etrog para determinar posibles diferencias entre las variantes locales de CVd-IIIa y CVd-IIIb.

Capítulo 5

Ajuste e implementación de metodología RT-qPCR para la detección de viroides de cítricos

INTRODUCCIÓN

En lo que respecta al diagnóstico de viroides en cítricos, como se mencionó anteriormente, existen varias metodologías con sus ventajas y desventajas. Por las características del patógeno, no es posible utilizar metodologías serológicas.

La primera metodología utilizada fue el *indexing* biológico, utilizando como planta indicadora cidra Etrog o mandarina Parson Special. Es un método sensible y confiable, pero tiene la desventaja de que no es específico. Además, requiere de un gran número de plantas y de periodos de incubación de varios meses a 28-30°C, lo que lo hace costoso, y son necesarios recursos humanos capacitados para la observación de síntomas en plantas indicadoras y para el manejo y mantenimiento de las mismas durante el período de invernáculo. Los ensayos biológicos han tenido un rol importante en el reconocimiento de estos patógenos antes del desarrollo de las herramientas moleculares, y aún lo siguen teniendo en muchas partes del mundo como complemento. Además, estos siguen siendo utilizados para la caracterización de los viroides y su patogenicidad, y en algunos programas de certificación (Bernad *et al.*, 2006; Nie y Singh, 2017).

Las otras dos opciones de diagnóstico para viroides que resultan altamente específicas y con buena sensibilidad son la electroforesis secuencial y la hibridación molecular. Ambas requieren un periodo de incubación de la muestra en cidra Etrog como hospedante bioamplificador (Bernad *et al.*, 2006).

Con la necesidad de acelerar la detección de patógenos surgió la utilización de la metodología PCR (*Polymerase chain reaction* (PCR)) por su gran sensibilidad y especificidad. Para el caso de los viroides se requiere la inclusión de un paso previo de transcripción reversa. Cabe destacar que los viroides fueron los primeros patógenos de plantas para los cuales se utilizó la reacción RT-PCR (Hadidi y Yang, 1990; Faggioli *et al.*, 2017).

Las metodologías habilitadas para diagnóstico de viroides en material cítrico en Argentina son el *indexing* biológico, la electroforesis secuencial (sPAGE), y recientemente se incorporó RT-PCR (Resolución INASE N° 479/2023). En el presente trabajo se propuso el ajuste e implementación de protocolos de RT-PCR, pero cuantitativa (RT-qPCR) para la detección de viroides de cítricos de manera de poder utilizarla luego en el diagnóstico de rutina de plantas candidatas y madres, tarea que lleva a cabo el Laboratorio de Protección Vegetal y Biotecnología de INTA EEA Concordia. Dicha estación experimental es la encargada de mantener dichas plantas madres de cítricos. Además, es un objetivo poder utilizar esta metodología en un futuro como parte de las habilitadas para el Programa de Certificación de Cítricos una vez que INASE (Instituto Nacional de Semillas) así lo autorice.

El objetivo principal de este capítulo es ajustar 4 protocolos de RT-qPCR para los principales viroides de cítricos presentes en el país: CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd.

RESULTADOS

5.A. Selección de cebadores para los viroides CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd, y para los genes vegetales seleccionados como controles internos.

Actualmente, hay diversos grupos de trabajo a nivel mundial que se dedican a estudiar estos patógenos, y muchos de ellos han diseñado cebadores para su detección, que están disponibles en bibliografía. En el presente trabajo se decidió utilizar los cebadores publicados por Bernad *et al*, 2006.

En la Tabla 19 se detalla los cebadores elegidos, para los cuales se verificó identidad con las secuencias blanco en los viroides utilizados como referencia que se encuentran en las bases de datos. También se seleccionaron genes que serán utilizados como controles internos en la cuantificación por RT-qPCR para los diferentes hospedantes experimentales: cidra Etrog, tomate y pepino y se diseñaron cebadores para ellos. El software utilizado para esto fue el Primer3Plus Versión 3.3.0, que es de uso abierto y online. En la Tabla 19 se resumen las características de los distintos pares utilizados.

Cebador	Tamaño	Secuencia blanco	Tamaño del fragmento amplificado	Temperatura de <i>melting</i>
CEVd-F4	20nt	Fragmento del genoma de CEVd (NC_001464.1)	115nt	61.1°C
CEVd-R1	18nt			60.0°C
HSVd-F1	22nt	Genoma de HSVd (NC_001351.1)	302nt	60.7°C
HSVd-R1	23nt			62.3°C
CDVd-F3	21nt	Fragmento del genoma de CDVd (NC_003264.1)	85nt	67.2°C
CDVd-R1	20nt			60.9°C
CBLVd-F1	20nt	Genoma de CBLVd (NC_001651.1)	315nt	67.0°C
CBLVd-R1	20nt			62.2°C
CBCVd-F3	19nt	Fragmento del genoma de CBCVd (NC_003539.1)	137nt	54.9°C
CBCVd-R1	18nt			57.2°C
Ubiq1-F	20nt	Fragmento del gen de ubiquitina de <i>Citrus sinensis</i> (GU362416.1)	193nt	63.1°C
Ubiq2-R	20nt			62.9°C
COX-F	22nt	Fragmento gen de citocromo oxidasa (CX297817.1) de <i>Citrus sinensis</i>	68nt	63.2°C
COX-R	22nt			60.7°C
UbiqT-F	20nt	Fragmento del gen de ubiquitina de tomate (NM_001366381.1)	193nt	61.4°C
UbiqT-R	20nt			65.3°C
UbiqP-F	20nt	Fragmento del gen de ubiquitina de pepino (XM_031880415.1)	193nt	67.6°C
UbiqP-R	20nt			56.7°C

Tabla 19: Cebadores seleccionados para la detección de los viroides (Bernad *et al.*, 2006). Se detalla el tamaño del cebador, la secuencia blanco de cada par, el tamaño de los fragmentos amplificados, así como las temperaturas de *melting* (T_m).

Se calculó la eficiencia de amplificación para cada par elegido, como se muestra en la siguiente sección.

5.B. Cálculo de eficiencia para los pares de cebadores elegidos

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el intercalante SYBR® Green y en un solo paso donde se incluyó la retrotranscriptasa y la Taq polimerasa juntas. Para la optimización de cada RT-qPCR, se analizaron los comportamientos de las curvas de fluorescencia y se calculó la eficiencia de amplificación para cada par de cebadores. Se realizaron determinaciones por duplicado para diferentes diluciones de ARN utilizando extracciones hechas desde las plantas testigos del banco (ver Materiales y Métodos). Posteriormente se graficó el \log^{10} del factor de dilución vs el valor del Ct para cada dilución. Se aplicó regresión lineal, y la pendiente obtenida se utilizó para calcular la eficiencia (E) según la ecuación (3):

$$E = 10^{\frac{-1}{\text{pendiente}}}$$

Ecuación 3: Cálculo de la eficiencia de amplificación.

La eficiencia se expresó como porcentajes según $((E - 1) \times 100\%)$. Estas curvas nos permitieron además seleccionar la concentración óptima de ARN a utilizar en las RT-qPCR para cada viroide, eligiendo aquella que nos permita obtener Cts entre 20-25, y la forma de la curva de fluorescencia siga la fase inicial estacionaria, seguida de una exponencial, y por último de una fase meseta típicas de una curva de qPCR. Los valores de eficiencia para un ensayo exitoso deberían estar entre 90-110% aproximadamente (Bustin *et al.*, 2010; Integrated DNA Technologies, 2012).

A continuación, se presentan los ensayos y resultados realizados para el cálculo de eficiencia de cada RT-qPCR para cada viroide y para los transcriptos utilizados como controles internos para la cuantificación relativa. Además, se buscó determinar el límite de detección que corresponde a la concentración más baja a la cual aún es posible detectar el blanco, en nuestro caso los viroides (Bustin *et al.*, 2010; Integrated DNA Technologies, 2012).

5.B.1. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CEVd

En primer lugar, se llevaron a cabo RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 55). Se resumen en la Tabla 20 los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

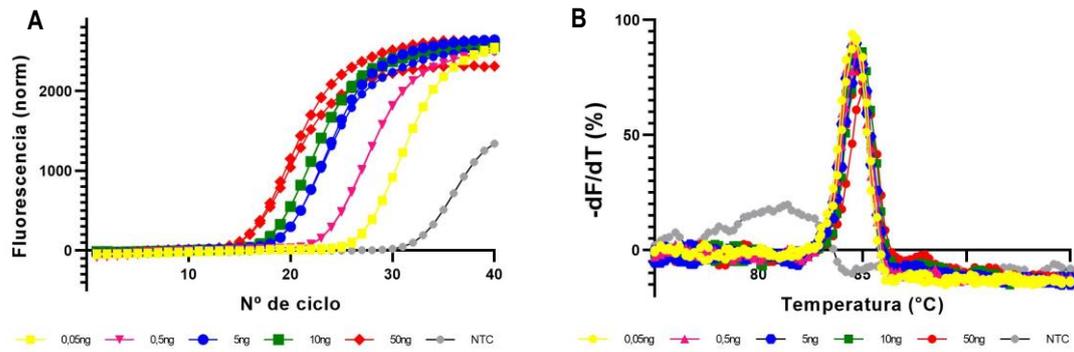


Figura 55: RT-qPCR para CEVd. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores F4/R1. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,05	1/1000	-3	27,25 – 27,34	27,30	0,06
0,50	1/100	-2	23,80 – 23,75	23,78	0,04
5,00	1/10	-1	19,68 – 19,73	19,71	0,04
10,00	1/5	-0.699	18,61 – 18,47	18,54	0,10
50,00	1/1	0	16,44 – 16,32	16,38	0,08

Tabla 20: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para la RT-qPCR para CEVd. DS: desviación estándar.

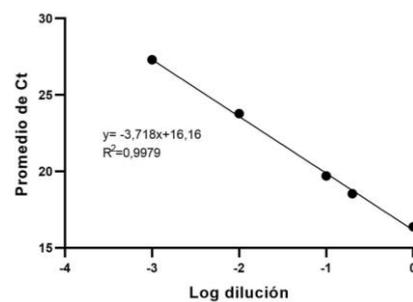


Figura 56: Regresión lineal correspondiente al valor de “Promedio de Ct vs Log dilución” de la Tabla 20. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 56), se obtuvo una eficiencia del 86%. Además, se infirió que el límite de detección de esta técnica para las condiciones detalladas, es de 0,05 ng de ARN total dado que fue el último punto experimental que produjo amplificación. Diluciones menores a 0,05 ng de ARN total, no produjeron amplificación.

Las mismas corridas y cálculos se realizaron para los demás pares de cebadores ensayados, como se detalla a continuación.

5.B.2. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para HSVd

Primero, se realizó la RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 57). En la Tabla 21 se muestran los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

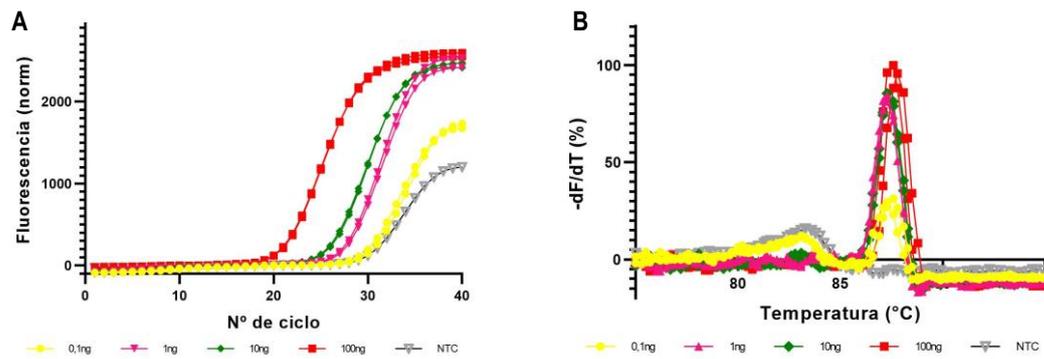


Figura 57: RT-qPCR para HSVd. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores F1/R1. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,1	1/1000	-3	30,94 – 31,02	30,98	0,06
1	1/100	-2	27,28 – 27,02	27,15	0,18
10	1/10	-1	25,37 – 25,53	25,45	0,11
100	1/1	0	20,53 – 20,61	20,57	0,06

Tabla 21: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para la Rt-qPCR para HSVd.
DS: desviación estándar

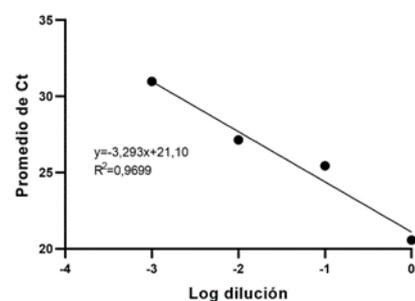


Figura 58: Regresión lineal correspondiente al valor de "Promedio de Ct vs Log dilución" de la Tabla 21. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 58), se calculó una eficiencia del 101% para el par F1/R1 para HSVd, y determinamos que el límite de detección de esta RT-qPCR es de 0,1 ng de ARN total, dado que fue el último punto experimental que pudo ser amplificado con éxito. Se intentó una dilución aún menor de 0,01 ng de ARN total, pero no se obtuvo amplificación.

5.B.3. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CDVd

En primera instancia, se realizó RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas a partir de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 59). En la Tabla 22 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

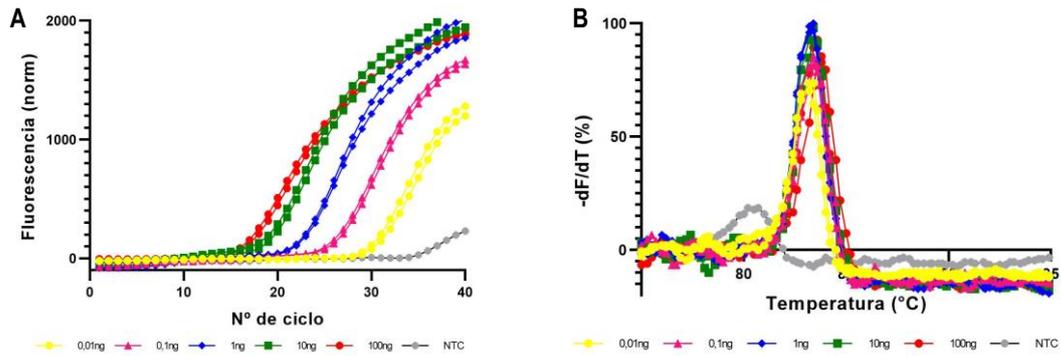


Figura 59: RT-qPCR para CDVd. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores F3/R1. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,01	1/10000	-4	31,26 – 31,88	31,57	0,44
0,1	1/1000	-3	27,25 – 26,87	27,06	0,27
1	1/100	-2	23,25 – 23,47	23,36	0,16
10	1/10	-1	20,07 – 19,46	19,77	0,43
100	1/1	0	17,80 – 18,28	18,04	0,34

Tabla 22: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para CDVd. DS: desviación estándar.

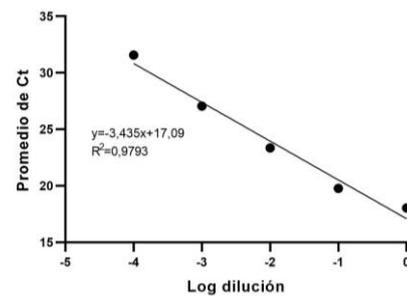


Figura 60: Regresión lineal correspondiente al valor de “Promedio de Ct vs Log dilución” de la Tabla 22. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 60), se obtuvo una eficiencia del 95% para el par de cebadores utilizados para CDVd, y según las curvas de amplificación se pudo estimar el valor del límite de detección de esta reacción en 0,01 ng de ARN total.

5.B.4. Cálculo de eficiencia y límite de detección para el par de cebadores para CBLVd

Primero se realizó la RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas a partir de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 61). En la Tabla 23 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones seriadas.

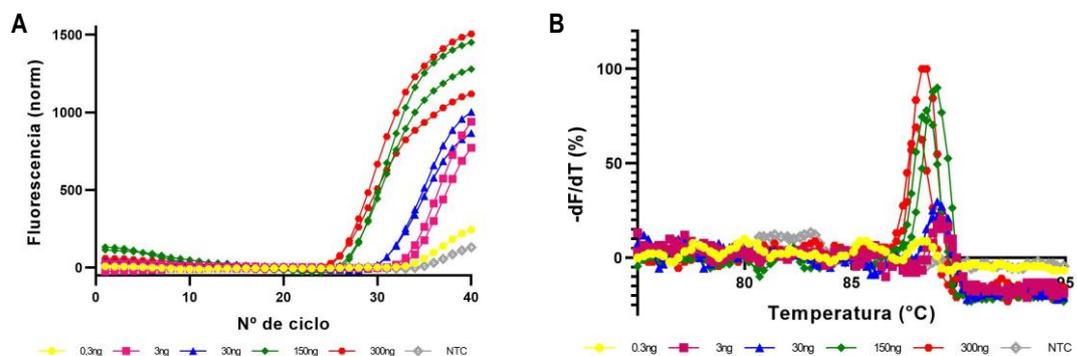


Figura 61: RT-qPCR para CBLVd. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores F1/R1. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,3	1/1000	-3	36,64	36,64	-
3	1/100	-2	33,81 – 34,50	34,50	0,49
30	1/10	-1	31,78 – 31,81	31,80	0,02
150	½	-0,30	27,63 – 27,76	27,70	0,09
300	1/1	0	26,64 – 26,60	26,62	0,03

Tabla 23: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para CBLVd. DS: desviación estándar.

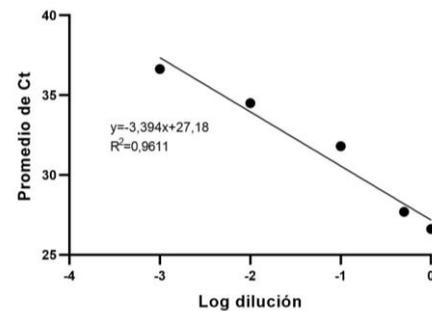


Figura 62: Regresión lineal correspondiente al valor de "Promedio de Ct vs Log dilución" de la Tabla 23. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 62), se obtuvo una eficiencia del 97% para el par de cebadores F1/R1 utilizados para CBLVd. Además, vimos que el límite de detección es de 0,3 ng de ARN total, ya que fue el último punto que fue posible la detección.

Para los controles internos elegidos también se realizó un cálculo de eficiencia ya que es necesario a la hora de la cuantificación relativa. Se realizó la estimación en cidra Etrog y en tomate.

5.B.5. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcrito de ubiquitina de cidra Etrog

En primer lugar, se realizó RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 63). En la Tabla 24 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

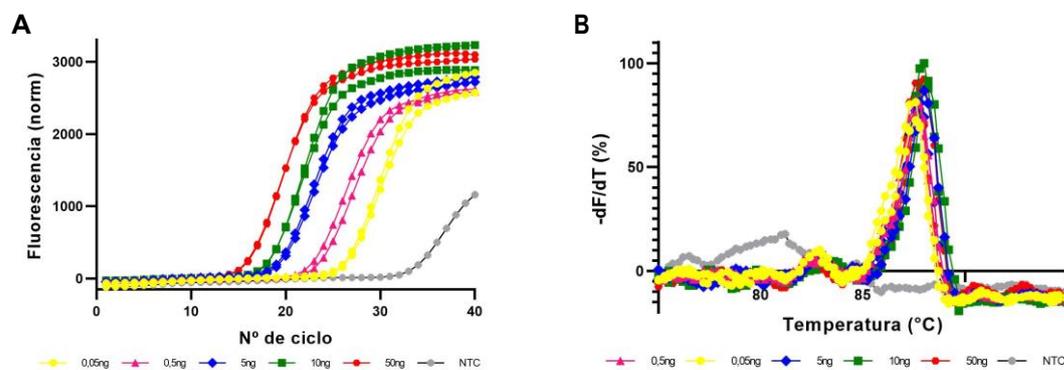


Figura 63: RT-qPCR para ubiquitina en cidra. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores Ubiq1/Ubiq2 en cidra Etrog. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,05	1/1000	-3	26,40 – 26,66	26,53	0,18
0,50	1/100	-2	23,07 – 23,82	23,45	0,53
5,00	1/10	-1	19,68 – 19,42	19,55	0,18
10,00	1/5	-0.699	18,28 – 18,36	18,32	0,06
50,00	1/1	0	16,14 – 16,00	16,07	0,10

Tabla 24: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para ubiquitina en c. Etrog. DS: desviación estándar.

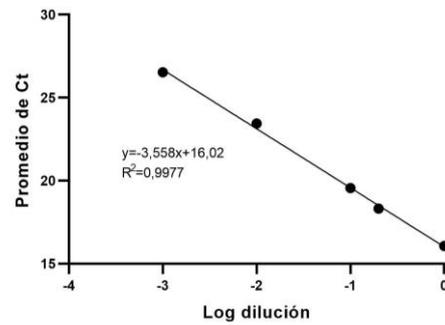


Figura 64: regresión lineal correspondiente al valor de "Promedio de Ct vs Log dilución" de la Tabla 24. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 64), se obtuvo una eficiencia del 91% para el par de cebadores Ubiq1/Ubiq2.

5.B.6. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcrito de ubiquitina de tomate

Primero se realizó la RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas a una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 65). En la Tabla 25 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

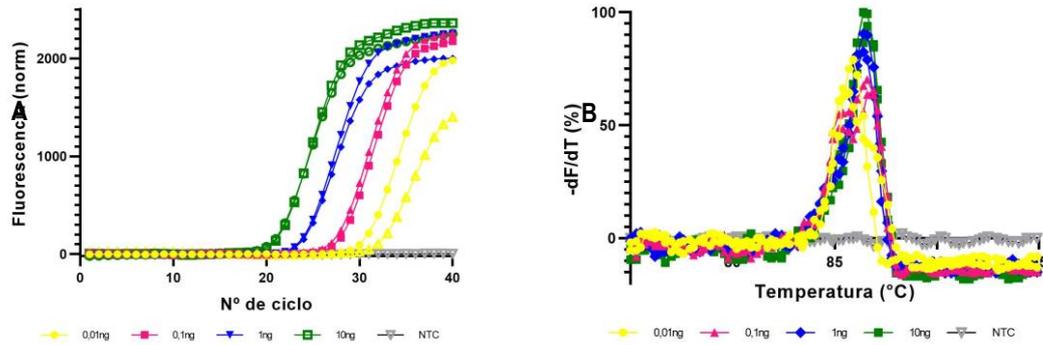


Figura 65: RT-qPCR para ubiquitina en tomate. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores Ubiq1/Ubiq2 en tomate. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,01	1/10000	-3	32,08 – 30,20	31,14	1,33
0,10	1/1000	-2	27,48 – 26,96	27,22	0,37
1,00	1/100	-1	23,49 – 23,68	23,59	0,13
10,00	1/10	0	20,54 – 20,77	20,66	0,16

Tabla 25: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para ubiquitina en tomate. DS: desviación estándar.

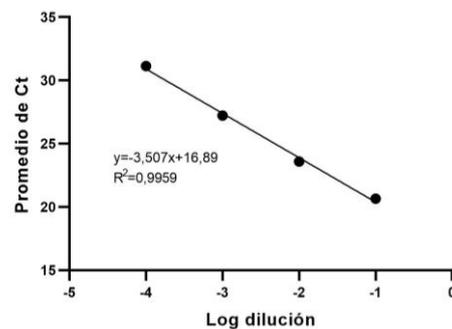


Figura 66: regresión lineal correspondiente al valor de “Promedio de Ct vs Log dilución” de la Tabla 25. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 66), se obtuvo una eficiencia del 93% para el par de cebadores UbiqT F/R.

5.B.7. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcripto de COX (citocromo oxidasa) de cidra Etrog

En primer lugar, se realizó RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 67). En la Tabla 26 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

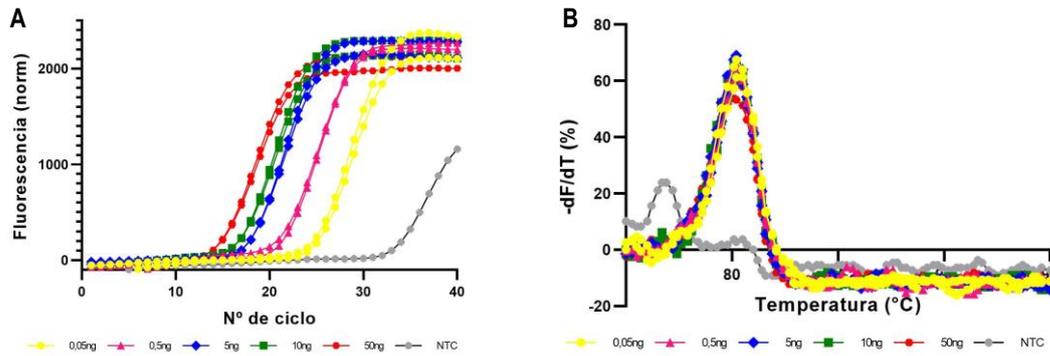


Figura 67: RT-qPCR para COX en cidra Etrog. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores COX-F/R en cidra Etrog. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,05	1/1000	-3	25,08 – 25,57	25,33	0,37
0,50	1/100	-2	21,80 – 21,28	21,54	0,35
5,00	1/10	-1	18,27 – 18,28	18,28	0,01
10,00	1/5	-0.699	17,15 – 17,16	17,16	0,01
50,00	1/1	0	15,24 – 15,34	15,29	0,07

Tabla 26: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para COX en c. Etrog.

DS: desviación estándar.

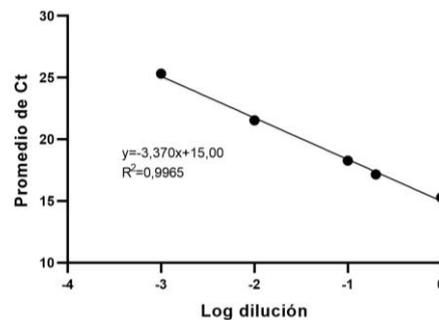


Figura 68: regresión lineal correspondiente al valor de “Promedio de Ct vs Log dilución” de la Tabla 26. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Utilizando el valor de la pendiente de la regresión (Figura 68), se obtuvo una eficiencia del 98% para los cebadores COX F/R, y, además, al igual que ubiquitina, al ser un control interno, la cantidad de nanogramos a utilizar va a variar según el viroide a detectar.

5.B.8. Cálculo de eficiencia para el par de cebadores para el transcrito de COX de tomate

En primer lugar, se realizó RT-qPCR por duplicado de diluciones seriadas de una muestra con concentración de ARN total conocida (Figura 69). En la Tabla 27 se resumen los valores de Ct obtenidos para las distintas diluciones realizadas.

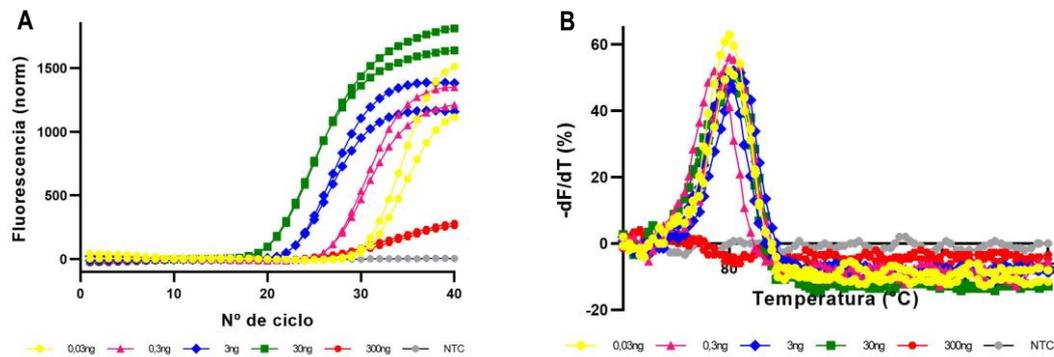


Figura 69: RT-qPCR para COX en tomate. A) Curvas de fluorescencia de RT-qPCR de diferentes diluciones de ARN total para el cálculo de la eficiencia del par de cebadores COX-F/R en tomate. B) Curvas de *melting* para las mismas reacciones. Se muestran en diferentes colores los duplicados para cada una de las concentraciones ensayadas. NTC: *no template control*.

ng ARN	Factor de dilución	Log dilución	Ct	Promedio de Ct	DS Ct
0,03	1/1000	-4	30,92 – 30,26	30,59	0,47
0,3	1/100	-3	26,81 – 26,76	26,79	0,04
3	1/10	-2	22,86 – 22,87	22,87	0,05
30	1/5	-1	20,05 – 19,98	20,02	0,85
300	1/1	0	31,70 – 30,50	-	-

Tabla 27: Cts obtenidos para las respectivas diluciones seriadas ensayadas para las RT-qPCR para COX en tomate. DS: desviación estándar.

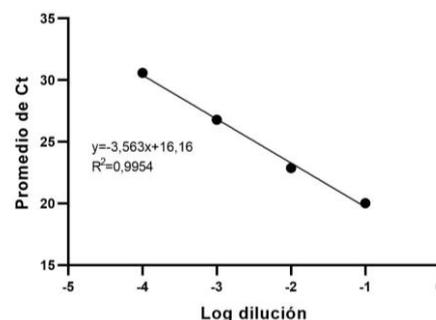


Figura 70: regresión lineal correspondiente al valor de “Promedio de Ct vs Log dilución” de la Tabla 27. La pendiente resultante se utiliza para el cálculo de la eficiencia con la ecuación 3.

Como puede verse para el punto de 300 ng de ARN total no hubo amplificación, el cual inferimos se debe a inhibición de la reacción por exceso de molde, pero se tomó el resto de puntos para la regresión (Figura 70), obteniendo una eficiencia del 91% para el par de cebadores en tomate.

A modo de resumen, se muestra en la Tabla 28 los valores de límite de detección y eficiencias obtenidas para cada par de cebadores de los distintos viroides.

Par de cebadores	Eficiencia (%)	Límite de detección (ng)
CEVd-F4/ CEVd-R1	86	0,1
HSVd-F1/ HSVd-R1	101	0,1
CDVd-F3/ CDVd-R1	95	0,01
CBLVd-F1/ CBLVd-R1	94	0,3

Tabla 28: Eficiencias y límite de detección obtenidos para los pares de cebadores utilizados en las RT-qPCR.

Como se comentó antes, la nueva normativa publicada en 2023 por INASE habilita nuevas metodologías para el diagnóstico de patógenos. Se incorporó la RT-PCR para la detección de viroides, además de continuar con el indexing biológico y sPAGE que ya se venían aplicando. En este trabajo hemos abordado el ajuste de la RT-qPCR porque su sensibilidad es aún mayor y presenta otras ventajas comparativas frente a la RT-PCR de tiempo final como es la monitorización en tiempo real de la amplificación. Por esta razón, uno de los objetivos fundamentales de este trabajo de tesis fue optimizar el diagnóstico de viroides, buscando reducir los tiempos requeridos y hacer más eficiente el proceso para aquellos profesionales dedicados a este tipo de análisis.

5.C. Implementación de protocolos de RT-qPCR que permitan detectar los viroides en estudio en muestras provenientes de distintas especies vegetales.

A partir de los cálculos de eficiencia y límites de detección antes detallados, se lograron optimizar cuatro protocolos para cada uno de los viroides de interés. Para mayor detalle de cada uno de ellos, ver el ANEXO V donde se detalla cada protocolo según el gen blanco a amplificar.

Ya optimizadas las RT-qPCR, se procedió a analizar las 108 muestras provenientes de cidra Etrog inoculadas con muestras de campo con sintomatología típica de infección por viroides, recolectadas de la zona citrícola del Río Uruguay (ver capítulo 1 de este trabajo). Los plantines de cidra Etrog son utilizados por su capacidad de amplificar naturalmente los viroides.

Los resultados obtenidos de las RT-qPCR de las muestras testigo y de las de campo fueron 100% coincidentes con los obtenidos por indexing biológico y sPAGE (ver capítulo 1). Estos resultados permitieron analizar 108 plantines, y confirmar 40 plantines positivos para CEVd, y 68 positivos para los viroides CDVd y HSVd, ya que siempre los encontramos en mezcla; mientras que CBLVd y CBCVd no fueron detectados.

Los protocolos de RT-qPCR para los viroides CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd, podrán ser adoptados en un futuro cercano para complementar y/o reemplazar los diagnósticos actuales. En cuanto a protocolo de CBCVd se logró optimizar la RT-qPCR y analizar las 108 plantas con un ARN testigo positivo proveniente de otra zona geográfica. Resta estimar el valor de eficiencia y límite de detección.

Las metodologías ajustadas fueron también aplicadas para cuantificar los viroides aislados de las muestras de campo e inoculados en hospedantes alternativos (tomate o pepino) de manera de evaluar diferencias en la acumulación entre ellos y su relación con la severidad de los síntomas y determinantes de secuencia (ver capítulos 2, 3 y 4).

DISCUSIÓN

La optimización de las condiciones de las RT-qPCR ha permitido establecer protocolos confiables y reproducibles, proporcionando una herramienta complementaria para el análisis preciso de muestras vegetales de diferentes especies, principalmente para material cítrico, que es lo que más interesa para su posterior implementación en laboratorios que realicen diagnósticos de viroides de manera oficial.

Se ajustaron nuevos protocolos de RT-qPCR para los viroides de cítricos CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd. Los valores de eficiencia obtenidos se encuentran dentro de rangos aceptables (entre 90-110%) para la mayoría, excepto para la RT-qPCR de CEVd, donde se obtuvo un valor del 86% de eficiencia. De todas maneras, el comportamiento de las curvas y el nivel de detección y la reproducibilidad alcanzados para esta reacción es más que aceptable para su implementación en diagnóstico. Los límites de detección fueron buenos en comparación con reportes similares (Papayiannis, 2014). Los valores obtenidos son similares entre los distintos protocolos, lo que nos permite la detección en niveles de 0,3 ng y 0,01 ng de ARN total. Además, la implementación de estas RT-qPCR ajustadas nos permitió realizar la cuantificación relativa de los viroides en los hospedantes alternativos, donde evaluamos los distintos aislamientos. Esto facilitó el estudio de la evolución de la infección y las posibles asociaciones de la sintomatología con la acumulación de los viroides.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Los viroides reportados mundialmente para cítricos actualmente son ocho: *Citrus Exocortis viroid* (CEVd), *Hop stunt viroid* (HSVd), *Citrus dwarfing viroid* (CDVd), *Citrus bent leaf viroide* (CBLVd), *Citrus bark cracking viroid* (CBCVd), *Citrus viroid V* (CVd-V), *Citrus viroid VI* (CVd-VI) y *Apscaviroid cvd-VII* (CVd-VII). Con el desarrollo de la presente tesis concluimos que los viroides presentes en la región citrícola del Río Uruguay son CEVd, HSVd y CDVd, estando ausentes los viroides CBLVd y CBCVd en las muestras evaluadas. Si bien existen otros tres viroides como se mencionó, los mismos no fueron analizados en esta tesis ya que son menos difundidos a nivel mundial, algunos de ellos aún restringidos a ciertas áreas o países (Tessitori, 2017; Najjar *et al.*, 2017; Chambers *et al.*, 2018). Además, no se evidenció la presencia de ellos mediante la metodología de sPAGE. Estos resultados coinciden con el único reporte previo sobre viroides presentes en la zona del Río Uruguay (Plata *et al.*, 2002). En Argentina, también se ha reportado la detección de viroides de cítricos en el noroeste del país, según el estudio realizado por Figueroa y colaboradores en 2010. Ellos informaron la presencia de CEVd, HSVd y otros viroides, que hasta ese momento no habían sido identificados y caracterizados. Años después, en el 2019, Palacios y colaboradores reportaron la presencia de CDVd y CBLVd para la misma región citrícola. Dada la proximidad de la zona de interés con la región citrícola de la República Oriental del Uruguay, también tomamos como antecedente el estudio realizado por Pagliano *et al.* (2013), donde se describió la presencia de CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd. En dicho informe, se identificó la combinación HSVd-CDVd como la más difundida, seguida por CEVd-HSVd-CDVd. Estos datos son coincidentes con los hallazgos que se reportan en el presente trabajo.

El porcentaje de plantas infectadas del total de las que presentaban síntomas a campo fue del 94%, siendo muy buena la correlación entre sintomatología a campo y presencia de viroides. Esto no siempre es así ya que la manifestación de síntomas en campo depende no sólo de él o los viroides presentes, sino que también de la edad de la planta al momento de la infección y de las condiciones fitosanitarias en las que se encuentre. Si la planta se infecta cuando ya es adulta, los síntomas a campo difícilmente se expresen o sean visibles (Duran-Vila, 2004). De esto podríamos inferir que las infecciones datan de largo tiempo ya que las plantas en su mayoría manifestaban síntomas muy evidentes. En cuanto al porcentaje total de muestras positivas para al menos algún viroide o una combinación de ellos fue del 74% considerando el total de las muestras colectadas (con y sin síntomas). Este último valor, es cercano al reportado para el país fronterizo por Pagliano y colaboradores (2013) que obtuvieron un porcentaje del 62%.

Los porcentajes de aparición de cada viroide, considerando el total de muestras, son del 37,04% para CEVd y del 62,96% para HSVd y CDVd. Los tres viroides fueron mayoritariamente encontrados agrupados, manifestándose ya sea como una mezcla de HSVd y CDVd (50%) o en una infección triple con CEVd, HSVd y CDVd (35%). La combinación HSVd-CDVd está reportada como una de las más diseminadas seguida por CEVd-HSVd-CDVd (Pagliano *et al.*, 2013). Sin embargo, en otros informes, la combinación más difundida fue la triple CEVd-HSVd-CDVd (Ito *et al.*, 2002; Najjar *et al.*, 2017). Todos los reportes parecen coincidir en que los viroides CEVd, HSVd

y CDVd son los más diseminados (Tessitori, 2017). A su vez, CEVd fue el único que se lo encontró en infección simple en este trabajo (15%).

Los árboles de cítricos pueden ser naturalmente infectados por varias combinaciones de viroides, y dichas mezclas pueden causar sinergismos o antagonismos en los síntomas que provocan su presencia (Tessitori, 2017; Verniere *et al.*, 2006). Se ha visto que plantas indicadoras coinoculadas con diferentes viroides pueden propiciar sinergismos, mientras que en otras especies de cítricos se desencadena mayormente protección cruzada y antagonismos para viroides de la misma especie o aquellos muy cercanos (Verniere *et al.*, 2006). Verniere y colaboradores (2006) reportaron antagonismo en una combinación de CEVd y CVd-IV, y sinergismo para CBLVd, CDVd y CVd-IV, al igual que para la combinación CEVd-CDVd. En este trabajo podríamos proponer sinergismos entre estos dos últimos viroides en la muestra M33 donde se vio que CDVd aislado de dicha muestra e inoculado en cidra Etrog mostraba una severidad más moderada en la sintomatología en comparación de los síntomas expresados a campo o en cidra antes del aislamiento donde eran severos. Estos fenómenos podrían de alguna manera condicionar las combinaciones encontradas a campo favoreciendo aquellas que funcionan sinérgicamente en un determinado hospedante.

Nuestro país cuenta con un Programa Nacional de Certificación de Cítricos desde el año 1998 (Resolución 149/98 ex SAGPyA y sus modificatorias, derogada por la Resolución INASE N° 458/2023) el cual es fiscalizado por el Instituto Nacional de Semillas (INASE). Dicho programa habilita el diagnóstico de viroides de cítricos mediante *indexing* biológico, sPAGE o RT-PCR, esta última incorporada el pasado año (Resolución INASE N° 479/2023). Las metodologías de diagnóstico utilizadas en el presente trabajo fueron *indexing* biológico, sPAGE y RT-qPCR. Sobre las mismas, podemos concluir, con las ventajas y desventajas particulares de cada una, que los resultados fueron consistentes y coincidentes entre técnicas. Aunque en Argentina aún es posible utilizar el diagnóstico biológico en el Programa Nacional de Certificación de Cítricos, es necesario considerar que hay reportes de ciertas variantes de CEVd que no generan síntomas en la planta indicadora cidra Etrog (*Citrus medica*) pero si pueden replicarse y mantenerse de forma latente (Murcia *et al.*, 2011). Por esta razón consideramos un importante avance la incorporación de nuevas metodologías como la RT-PCR o RT-qPCR para complementar la detección. En otros países se recomienda el uso de ensayos biológicos complementados con métodos moleculares (Murcia *et al.*, 2011). En relación a esto, en el presente trabajo se ajustaron nuevos protocolos de RT-qPCR para los viroides de cítricos CEVd, HSVd, CDVd y CBLVd. Las metodologías mostraron valores de eficiencia dentro de rangos aceptables o muy cercanos a ellos (entre 86-101%), y los límites de detección fueron buenos en comparación con reportes similares (Papayiannis, 2014), permitiéndonos la detección en niveles de 0,3 ng y 0,01 ng de ARN total. Esta técnica es rápida, específica y sensible para la detección de viroides en varios tipos de material vegetal y permitirá contar con una herramienta más a la hora de realizar el diagnóstico de estos agentes, actualizando las metodologías ya existentes en la normativa.

La información disponible, en general, sobre viroides de cítricos en Argentina es escasa, y más aún sobre las variantes nucleotídicas de los mismos. En este trabajo, se logró obtener secuencias nucleotídicas completas de los viroides CEVd, HSVd y CDVd, que se encuentran en la región

citricola del Río Uruguay, lo que nos proporciona un mayor conocimiento sobre las variantes presentes.

El presente trabajo es el primero que documenta secuencias de estos patógenos en dicha región y el primer reporte de caracterización de variantes nucleotídicas en el país para los viroides HSVd y CEVd.

Se caracterizaron variantes leves y severas de CEVd presentes en la región citrícola del Río Uruguay mediante la comparación con las secuencias reportadas por Visvader y Symons (1985), y comparando las estructuras secundarias de éstas con las publicadas. Se observó que ambas regiones, entre los nucleótidos 61 y 70, y entre los 228 y 237 aproximadamente, presentan los cambios reportados para una secuencia severa (tipo A) en las muestras M33 y M42, mientras que M45 y M51 conservan las secuencias de la variante reportada como leve (tipo B). Además, estas secuencias de CEVd coinciden con el reporte de Murcia *et al.* (2011) sobre la correlación de la secuencia y la sintomatología, estableciendo nuevamente los cambios de nucleótidos de leve a severa: 63-A, 186A→U, 235U→A, 314G→A, 315A→U. Los aislamientos de M33 y M42 coinciden 100% con los cambios reportados para la variante severa, sin embargo, las muestras M45 y M51 no coinciden 100% con los cambios para la variante leve o asintomática, conservando dos de las cinco posiciones de referencia. Este dato podría ser correlacionado con el hecho de que los aislamientos M45 y M51 provocan síntomas en cidra, mientras que los cambios reportados por Murcia *et al.* (2011) para el tipo B describen una variante que no causa síntomas en cidra.

Otro informe adicional que aborda cambios específicos en la secuencia genética de CEVd relacionados con la sintomatología es el de Hajeri y colaboradores (2011), donde también se asocian ciertas posiciones con variantes más o menos infecciosas en diferentes hospedantes. Además, se correlacionan cambios de nucleotídicos con la estabilidad genética de dichas variantes. Las posiciones identificadas como más infecciosas y estables en su investigación no se encontraron en nuestras muestras analizadas, pero sí vimos que los cambios que se reportan para una secuencia no infecciosa, no se producen mayormente en nuestras secuencias, lo que sugiere que podrían ser infecciosas según su informe. Específicamente, la posición 30 U→C y la 182 U→C permanecen iguales a la original, mientras que en la posición 128 (G→A), donde G se asocia con infección y A no, las muestras M33 y M42 contienen G, mientras que M45 y M51 poseen A, coincidiendo con el perfil de severidad ya determinado según Visvader y Symons (1985) para estos cuatro aislamientos. Otras ubicaciones reportadas por Hajeri y colaboradores (2011) corresponden a cambios que generan variantes infecciosas pero que no son estables. Estas son 50 G→A y 108 +U. La última no está presente en ninguna de las muestras analizadas en este trabajo, y el cambio en la posición 50 sí está presente. M33 y M42 muestran G, y M45 y M51 presentan A en esa posición.

La evaluación de los aislamientos de CEVd mediante la inoculación en el hospedante alternativo (tomate), no nos permitió observar diferencias significativas en la sintomatología, pero si en la acumulación relativa del viroide evaluada por RT-qPCR, que correlacionó muy bien con los determinantes de secuencia que los asocia en variantes leves o severas (Visvader y Symons, 1985). Las muestras severas poseen una acumulación significativamente mayor que las leves.

Esto podría explicarse por una mejor interacción de las variantes severas con factores del hospedante que lleva a una mayor replicación del viroide. La utilización de tomate como hospedante alternativo para CEVd se sustenta en los reportes de expresión rápida de síntomas característicos de dicho viroide en comparación con otras especies (20 a 30 días) (Murcia, 2009; Cottilli *et al.*, 2019).

La baja expresión de síntomas de CEVd en tomate podría atribuirse a los cambios encontrados en las secuencias de los aislamientos caracterizados en el presente trabajo localizadas por fuera de las regiones señaladas como determinantes de severidad (en total 5/6 cambios), u otros que podrían haber surgido durante su replicación dentro de este hospedante. Es necesario considerar que las poblaciones de viroides que ingresan en una planta sufren cambios provocados por la presión de selección que ejerce el hospedante sobre el viroide (Murcia, 2009; Serra, 2009). La infección con una única secuencia resulta en general, según el modelo de cuasiespecies propuesto para replicones de ARN, en la generación de una nueva población. Se requiere tener presente que no todos los hospedantes o especies vegetales se comportan igual; se ha visto que los hospedantes asintomáticos actúan como reservorios de viroides, garantizando la supervivencia y promoviendo la diversidad genética (Bernad *et al.*, 2005). Las características moleculares que determinan el rango de hospedantes, se desconocen, pero probablemente dependen de las interacciones específicas del ARN con proteínas del hospedante que facilitan su replicación y movimiento (Murcia *et al.* (2011). Dicho esto, también los datos sobre la agresividad de diferentes aislamientos deben ser interpretados con cautela y ver si es posible extrapolar resultados a diferentes hospedantes. Evaluando los resultados presentados aquí para CEVd se puede concluir que existe correlación entre los determinantes de secuencia y la acumulación del viroide en tomate. Asimismo, los demás cambios encontrados por fuera de los determinantes que los clasifican como A y B también coinciden con regiones relacionadas a patogenicidad descritas en otros trabajos, para aislamientos de diferentes regiones geográficas (Murcia *et al.*, 2011; Hajeri *et al.*, 2011).

Para el caso del viroide HSVd todas las variantes encontradas en el muestreo realizado en el presente trabajo corresponden a cepas leves que no inducen la enfermedad caquexia en cítricos. Todos los aislamientos caracterizados se clasifican dentro del grupo CVd-IIa. No se descarta que estén presentes las dos variantes restantes, que, sí causan caquexia, ya que CVd-IIc (causante de caquexia) está presente en el país en la provincia de Tucumán. La información sobre dicha enfermedad en el país es muy escasa, al igual que su distribución en todo el territorio.

Los aislamientos de HSVd evaluados en el hospedante alternativo (pepino) fueron identificados como pertenecientes al grupo CVd-IIa y no mostraron diferencia de sintomatología entre ellos, sólo retraso de crecimiento respecto al control sin inocular. Las secuencias de las dos muestras caracterizadas contienen tres cambios entre ellas en la región conservada CCR que no afectarían la replicación y/o patogenicidad ya que estas características están principalmente asociadas a los dominios P y/o V. Además, contamos con un aislamiento de HSVd proporcionado por la EEA Obispo Colombes de Tucumán. Mediante el análisis de su secuencia, pudimos asociarlo al grupo CVd-IIc, conocido por causar caquexia (Reanwarakorn y Semancik, 1998), y fue posible observar la expresión de síntomas al inocular plantas de pepino con dicho aislamiento.

Con respecto a CDVd, el cual no están aún asociado a una enfermedad, pero si es causante de enanismo en cítricos, encontramos dos variantes de las tres reportadas, presentes en la región citrícola del Río Uruguay: CVd-IIIa y CVd-IIIb. Dos de las muestras secuenciadas pertenecen al grupo CVd-IIIa y una al grupo CVd-IIIb. Sin embargo, en muestreos realizados en España, Italia, Estados Unidos, Brasil y Omán se reportó mayor incidencia de la variante CVd-IIIb respecto a CVd-IIIa, y aún en menor proporción CVd-IIIc (Murcia *et al.*, 2009).

Los aislamientos de CDVd aislados por sPAGE presentan secuencias muy similares (99,66% de identidad), y en correlación con esto, no mostraron diferencias significativas de sintomatología cuando se inocularon individualmente en cidra Etrog. Además, como se mencionó antes, ciertas combinaciones de viroides causan sinergismo por lo que es probable que las diferencias en los niveles de sintomatología observadas en cidra Etrog cuando estaban en mezclas responda a estos mecanismos de cooperación, inexistentes cuando se los aísla (Verniere *et al.*, 2006).

En cuanto a los mecanismos que puedan explicar las diferencias en la sintomatología y acumulación de viroides en distintos hospedantes vegetales, se sabe que el silenciamiento postranscripcional mediado por pequeños ARN (ARNi) desempeña un papel fundamental. Los ARN pequeños cumplen una función reguladora esencial tanto en las respuestas antivirales del hospedante como en la patogénesis de los viroides (Borges y Martienssen, 2015; Dadami *et al.*, 2017; Flores *et al.*, 2017; Czech *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2018; Treiber *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Ramesh *et al.*, 2020; Dang *et al.*, 2021). Se han propuesto dos modelos para explicar la participación del ARNi en el proceso patogénico inducido por infecciones de viroides, y ambos implican a los ARN pequeños derivados de viroides (vdsARN). En el primer modelo, los vdsARN podrían actuar como microARNs (miARNs), regulando a la baja la expresión de genes del hospedante fisiológicamente importantes, induciendo así síntomas asociados a enfermedades. Los vdsARN contendrían una identidad significativa con una región del genoma hospedante para que este modelo funcione, y la resistencia de los viroides a la ARNi es una característica intrínseca al genoma del viroide (Wang *et al.*, 2004; Dang *et al.*, 2021).

Según el segundo modelo, los síntomas de enfermedad causados por pospiviroides replicándose en el núcleo podrían resultar de la incorporación de intermediarios de replicación del viroide en la vía de biogénesis de los *trans-acting siRNA* (tasiARN). El nucléolo es una zona libre de tasiARNs, y las formas maduras de viroides producidas en el nucléolo son resistentes a la degradación. En contraste, los (vd)tasiARN producidos en el núcleo a partir de intermediarios de replicación podrían luego trasladarse al citoplasma, donde guiarían la escisión de los transcritos targets de ARN del hospedante, conduciendo a los síntomas observados (Gómez *et al.*, 2009; Dang *et al.*, 2021).

Ambos modelos tienen como un elemento clave a las estructuras secundarias características de los viroides que pueden interpretarse como el compromiso evolutivo entre la necesidad de interactuar con factores hospedante y la necesidad de sobrevivir al mecanismo de resistencia de las plantas mediado por ARNi (Dang *et al.*, 2021).

Los árboles filogenéticos construidos para los tres viroides secuenciados mostraron, en general, una cercanía con las secuencias provenientes principalmente de Uruguay y/o Estados Unidos,

repitiéndose mayormente para los tres según los árboles construidos. También se observaron cercanos aislamientos de México y Brasil. A diferencia de otros estudios, donde muestras diferentes de una misma región siempre se agrupaban en un mismo clúster, sugiriendo que los distintos viroides podrían tener el mismo origen y haber sido introducidos por el mismo material vegetal de propagación (Najar *et al.*, 2017), los resultados aquí presentados muestran asociaciones algo diferentes para cada viroide por lo que podríamos suponer que los viroides de la región del Río Uruguay proceden de orígenes variados, probablemente respondiendo al flujo de material no saneado.

Con este trabajo se consiguió caracterizar molecularmente y a nivel de sintomatología viroides de cítricos presentes en una importante región productiva del país. Para algunas especies de viroides los resultados aquí presentados son los primeros reportes en el país. Además, estos resultados aportan al conocimiento básico de estos patógenos y su expresión en diferentes hospedantes, así como también contribuirán al manejo de los mismos, incluyendo su rápida y específica detección.

La investigación general sobre los viroides ha conducido a importantes descubrimientos en el campo del ARN y la biología vegetal. Comprenderlos no solo nos permite entender cómo, a pesar de su extrema simplicidad y tamaño pequeño, son capaces de completar ciclos infecciosos, sino que también abre la posibilidad de utilizarlos como herramientas, tal como se hace actualmente con ciertos viroides y virus (Ortolá y Daros, 2023). Aún existen numerosas preguntas por responder, es fundamental obtener un conocimiento exhaustivo de estos patógenos en el país, tarea en la creemos que hemos avanzado notoriamente en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara-Mendoza, S.; Vergara-Pineda, S.; García-Rubio, O.; Cambrón-Sandoval, V. H.; Colmenares-Aragón, D. y Nava-Díaz, C. (2017). Caracterización del Viroide exocortis de los cítricos en diferentes condiciones de indexado. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(2), 284–303. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1701-3>
- Anderson, C. M.; Fabiani, A.; Mika, R. H. y Larocca, L. (1996). Manual para productores de naranja y mandarina de la Región del Río Uruguay, INTA-Estación Experimental Agropecuaria Concordia.
- Barba, M. y Hadidi, A. (2017). Application of Next-Generation Sequencing Technologies to Viroids. In *Viroids and Satellites*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00038-3>
- Bernad, L. y Duran-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 20(2), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.11.001>
- Bernad, L.; Gandía, M. y Duran-Vila, N. (2005). Host Effect on the Genetic Variability of Citrus exocortis viroid (CEVd). International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010), 16(16). <https://doi.org/10.5070/c582q3068t>
- Biebricher, C. K. y Eigen, M. (2006). What is a quasispecies? *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 299, 1–31. https://doi.org/10.1007/3-540-26397-7_1
- Bio-Rad Laboratories, Inc. (2006). Real-Time PCR Applications Guide.
- Borges, F. y Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 727–741. doi: 10.1038/nrm4085
- Bustin, S. A.; Beaulieu, J. F.; Huggett, J.; Jaggi, R.; Kibenge, F. S. B.; Olsvik, P. A.; Penning, L. C. y Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>
- Chambers, G. A.; Donovan, N. J.; Bodaghi, S.; Jelinek, S. M. y Vidalakis, G. (2018). A novel citrus viroid found in Australia, tentatively named citrus viroid VII. *Archives of Virology*, 163(1), 215–218. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3591-y>
- Codoñer, F. M.; Daròs, J. A.; Solé, R. V. y Elena, S. F. (2006). The fittest versus the flattest: Experimental confirmation of the quasispecies effect with subviral pathogens. *PLoS Pathogens*, 2(12), 1187–1193. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020136>
- Cottilli, P.; Belda-Palazón, B.; Adkar-Purushothama, C. R.; Perreault, J. P.; Schleiff, E.; Rodrigo, I.; Ferrando, A. y Lisón, P. (2019). Citrus exocortis viroid causes ribosomal stress in tomato plants. *Nucleic Acids Research*, 47(16), 8649–8661. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ679>
- Czech, B.; Munafò, M.; Ciabrelli, F.; Eastwood, E. L.; Fabry, M. H.; Kneuss, E. y Hannon, G. J. (2018). piRNA-Guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annual Review of Genetics*, 52, 131–157. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120417-031441>
- Dadami, E.; Dalakouras, A. y Wassenegger, M. (2017). Chapter 11: Viroids and RNA Silencing. In *Viroids and Satellites*, 115-124. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00011-5>

- Dang, T.; Lavagi-Craddock, I.; Bodaghi, S. y Vidalakis, G. (2021). Next-Generation Sequencing Identification and Characterization of MicroRNAs in Dwarfed Citrus Trees Infected With Citrus Dwarfing Viroid in High-Density Plantings. *Frontiers in Microbiology*, 12(April). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.646273>
- De Francesco (2015a). Estudio del mecanismo de resistencia de plantas transgénicas híbridas de *Citrus sinensis* frente a *Citrus psorosis virus*. Tesis doctoral.
- De Francesco, A.; Costa, N.; Plata, M. I. y García, M. L. (2015b). Improved Detection of Citrus psorosis virus and Coat Protein-Derived Transgenes in Citrus Plants: Comparison Between RT-qPCR and TAS-ELISA. *Journal of Phytopathology*, 163(11–12), 915–925. <https://doi.org/10.1111/jph.12392>
- Di Serio, F.; Flores, R.; Verhoeven, J. T. J.; Li, S. F.; Pallás, V.; Randles, J. W.; Sano, T.; Vidalakis, G. y Owens, R. A. (2014). Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159(12), 3467–3478. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Di Serio, F.; Li, S. F.; Pallás, V.; Owens, R. A.; Randles, J. W.; Sano, T.; Verhoeven, J. T. J.; Vidalakis, G. y Flores, R. (2017). Chapter 13: Viroid Taxonomy. In *Viroids and Satellites*, 135–146. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00013-9>
- DuCharme, E. P. y Knorr, L. C. (1954). Vascular pits and pegs associated with diseases in citrus. *Plant disease reporter* (3), 127–142.
- Duran-Vila, N. (2004). Enfermedades de cítricos causadas por viroides: exocortis y caque xia. *Vida Rural*, page 52-56. <https://www.researchgate.net/publication/28279435>
- Duran-Vila, N. (2017). Chapter 16: Citrus Exocortis Viroid. In *Viroids and Satellites*, 169–179. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00016-4>
- Duran-Vila, N.; Flores, R. y Semancik, J. S. (1986). Characterization of viroid-like RNAs associated with the citrus exocortis syndrome. *Virology*, 150(1), 75–84. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90267-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90267-9)
- Duran-Vila, N.; Pina, J. A.; Ballester, J. F.; Juarez, J.; Roistacher, C. N.; Rivera-Bustamante, R. y Semancik, J. S. (1988a). The Citrus Exocortis Disease: A Complex of Viroid-RNAs. *International Organization of Citrus Virologists, Proceedings of the Tenth Conference*, 152-164 (Valencia, 1986). <https://doi.org/10.5070/c54cf7n8qb>
- Duran-Vila, N.; Roistacher, C. N.; Rivera-Bustamante, R. y Semancik, J. S. (1988b). A Definition of Citrus Viroid Groups and Their Relationship to the Exocortis Disease. *Journal of General Virology*, 69(12), 3069–3080. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-12-3069>
- Faggioli, F.; Luigi, M. y Boubourakas, I. N. (2017). Chapter 36: Viroid Amplification Methods: RT-PCR, Real-Time RT-PCR, and RT-LAMP. In *Viroids and Satellites*, 381-391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00036-X>
- Federcitrus (2022). *La actividad cítrica en Argentina, informe anual de Federcitrus*. 1–21.
- Figueroa, J.; Castellanos, A. F.; Foguet, L.; Escobar, C. y Stein, B. (2010). Confirmation of the presence of citrus viroids in citrus orchards in Northwestern Argentina. *Rev. Ind. y Agric. de Tucumán*, 87(1), 45–48.
- Flores, R.; Daròs, J.; Hernández, C.; Navarro, B. y Di Serio, F. (2020). Viroids. In *eLS: Encyclopedia of Life Sciences Issue 1*, page 192-203. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029141>

- Flores, R.; Di Serio, F.; Navarro, B. y Owens, R. A. (2017). Chapter 9: Viroid Pathogenesis, In *Viroids and Satellites*, 93–103. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801498-1.00009-7>
- Flores, R.; Hernández, C.; Martínez De Alba, A. E.; Daròs, J. A. y Di Serio, F. (2005). Viroids and viroid-host interactions. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 43, pp. 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Flores, R.; Minoia, S.; Carbonell, A.; Gisel, A.; Delgado, S.; López-Carrasco, A. y Di Serio, F. (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research*, 209, 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.027>
- Gómez, G.; Martínez, G. y Pallás, V. (2009). Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14, 264–269. [doi:10.1016/j.tplants.2009.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.002)
- Guerrero Gámez, A.; Enrique, C.; Gómez, A.; Guadalupe, O.; Mauleón, G.; Garza, G.; Ojeda, Á.; Genoveva, M. y Rodríguez, L. (2013). Detection of Three Citrus Viroids Species from Nuevo Leon and Tamaulipas, Mexico by Conventional and Real Time RT-PCR. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(1), 20–28. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61230974003>
- Hadidi, A. y Yang, X. (1990). Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification. *Journal of Virological Methods*, 30(3), 261–269. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(90\)90068-Q](https://doi.org/10.1016/0166-0934(90)90068-Q)
- Hadidi, A.; Vidalakis, G. y Sano, T. (2017). Chapter 2: Economic Significance of Fruit Tree and Grapevine Viroids. In *Viroids and Satellites*, 15-25.
- Hajeri, S.; Ramadugu, C.; Manjunath, K.; Ng, J.; Lee, R. y Vidalakis, G. (2011). In vivo generated Citrus exocortis viroid progeny variants display a range of phenotypes with altered levels of replication, systemic accumulation and pathogenicity. *Virology*, 417(2), 400–409. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.06.013>
- Hammond, R. W. (2017). Chapter 1: Economic Significance of Viroids in Vegetable and Field Crops. In *Viroids and Satellites*, 5-13.
- Hanold, D. y Vadamalai, G. (2017). Chapter 34: Gel Electrophoresis. In *Viroids and Satellites*, 357–367. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00034-6>
- Hataya, T.; Tsushima, T. y Sano, T. (2017). Chapter 19: Hop Stunt Viroid. In *Viroids and Satellites*, 199-210. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00019-X>
- INASE (2023a). RESOL-2023-458-APN-INASE#MEC. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-458-2023-387356>
- INASE (2023b). RESOL-2023-479-APN-INASE#MEC. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-479-2023-388023>
- Integrated DNA Technologies (2012). PrimeTime qPCR Application Guide 3rd Edition.
- Ito, T.; Ieki, H.; Ozaki, K.; Iwanami, T.; Nakahara, K.; Hataya, T.; Ito, T.; Isaka, M. y Kano, T. (2002). Multiple citrus viroids in citrus from Japan and their ability to produce exocortis-like symptoms in citron. *Phytopathology*, 92(5), 542–547. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.5.542>

- Jakse, J.; Radisek, S.; Pokorn, T.; Matousek, J. y Javornik, B. (2015). Deep-sequencing revealed Citrus bark cracking viroid (CBCVd) as a highly aggressive pathogen on hop. *Plant Pathology*, 64(4), 831–842. <https://doi.org/10.1111/ppa.12325>
- Lavagi, I.; Matoušek, J. y Vidalakis, G. (2017). Chapter 26: Other Cocadviroids. In *Viroids and Satellites*, 275–287. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00026-7>
- Lee, R. F.; Keremane, M. L. y Ramadugu, C. (2021). Use of young plants for biological indexing of graft transmissible pathogens of citrus Use of young plants for biological indexing of graft transmissible pathogens of citrus. *Crop Protection*, 143, 105524. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2020.105524>
- Li, W.; Hartung, J. S. y Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of Candidatus Liberibacter species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1), 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Marquez-Molins, J.; Gomez, G. y Pallas, V. (2021). Hop stunt viroid: A polyphagous pathogenic RNA that has shed light on viroid–host interactions. *Molecular Plant Pathology*, 22(2), 153–162. <https://doi.org/10.1111/mpp.13022>
- Murcia, N. (2009). Detección y caracterización agronómica de viroides de cítricos. Tesis doctoral.
- Murcia, N.; Bernad, L.; Caicedo, A. y Duran-Vila, N. (2010). Citrus Viroids in Colombia. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*, 17(17). <http://dx.doi.org/10.5070/C5008577nk>
- Murcia, N.; Bernad, L.; Duran-Vila, N. y Serra, P. (2011). Two nucleotide positions in the Citrus exocortis viroid RNA associated with symptom expression in Etrog citron but not in experimental herbaceous hosts. *Molecular Plant Pathology*, 12(2), 203–208. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00662.x>
- Murcia, N.; Bernad, L.; Serra, P.; Hashemian, S. M. B. y Duran-Vila, N. (2009). Molecular and biological characterization of natural variants of Citrus dwarfing viroid. *Archives of Virology*, 154(8), 1329–1334. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0430-9>
- Najar, A.; Hamdi, I.; Varsani, A. y Duran-Vila, N. (2017). Citrus viroids in Tunisia: Prevalence and molecular characterization. *J. Plant Pathol.* 99, 787–792.
- Navarro, B.; Flores, R. y Serio, F. di. (2021). *Annual Review of Virology Advances in Viroid-Host Interactions*. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919>
- Nie, X. y Singh, R. P. (2017). Chapter 33: Viroid Detection and Identification by Bioassay. In *Viroids and Satellites*, 347–356. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00033-4>
- Ohno, T.; Takamatsu, N.; Meshi, T. y Okada, Y. (1983). Hop stunt viroid: molecular cloning and nucleotide sequence of the complete cDNA copy. *Nucleic Acids Res.* 11(18): 6185-97. <https://doi.org/10.1093/nar/11.18.6185>
- Ortolá, B. y Daròs, J. A. (2023). Viroids: Non-Coding Circular RNAs Able to Autonomously Replicate and Infect Higher Plants. In *Biology*, 12(2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biology12020172>
- Osman, F.; Hodzic, E.; Kwon, S. J.; Wang, J. y Vidalakis, G. (2015). Development and validation of a multiplex reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) assay for the

- rapid detection of Citrus tristeza virus, Citrus psorosis virus, and Citrus leaf blotch virus. *Journal of Virological Methods*, 220, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.013>
- Pagliano, G.; Umaña Castro, R.; Pritsch, C.; Rivas, F. y Duran-Vila, N. (2013). Occurrence, prevalence and distribution of Citrus viroids in Uruguay. *Journal of Plant Pathology*, 95(3), 631–635. <https://doi.org/10.4454/JPP.V95I3.046>
 - Palacio-Bielsa, A.; Romero-Durbán, J. y Duran-Vila, N. (2004). Characterization of citrus HSVd isolates. *Archives of Virology*, 149(3), 537–552. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0223-5>
 - Palacios, M. F. y Figueroa, J. (2019). First report of Citrus Bent Leaf Viroid and Citrus Dwarfing Viroid in Argentina. *International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*
 - Pallás, V.; Sánchez-Navarro, J. A.; Kinard, G. R. y di Serio, F. (2017). Chapter 35: Molecular Hybridization Techniques for Detecting and Studying Viroids. In *Viroids and Satellites*, 369–379. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00035-8>
 - Papayiannis, L. C. (2014). Diagnostic real-time RT-PCR for the simultaneous detection of Citrus exocortis viroid and Hop stunt viroid. *Journal of Virological Methods*, 196, 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.11.001>
 - Parakh, D. B.; Zhu, S. y Sano, T. (2017). Chapter 47: Geographical Distribution of Viroids in South, Southeast, and East Asia. In *Viroids and Satellites*, 507-518. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00047-4>
 - Plata, M. I.; Costa, N.; Fabiani, A. y Anderson, C. M. (2002). Characterization of Nine Sources of Dwarfing Factors Used in Tree Size Control Trials at Concordia, Argentina. *International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*.
 - Rakowski, A. G.; Szychowski, J. A.; Avena, Z. S. y Semancik, J. S. (1994). Nucleotide sequence and structural features of the group III citrus viroids. *Journal of General Virology*, 75(12), 3581–3584.
 - Ramesh, S. V.; Yogindran, S.; Gnanasekaran, P.; Chakraborty, S.; Winter, S. y Pappu, H. R. (2020). Virus and viroid-derived small RNAs as modulators of host gene expression: molecular insights into pathogenesis. *Front. Microbiol.* 11:614231. doi: 10.3389/fmicb.2020.614231
 - Reanwarakorn, K. y Semancik, J. S. (1998). Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *Journal of General Virology*, 79(12), 3163–3171. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3163>
 - Reanwarakorn, K. y Semancik, J. S. (1999a). Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology*, 89(7), 568–574. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.7.568>
 - Reanwarakorn, K. y Semancik, J. S. (1999b). Discrimination of cachexia disease agents among citrus variants of hop stunt viroid. *Annals of Applied Biology*, 135(2), 481–487. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1999.tb00877.x>
 - Reuter, J. S. y Mathews, D. H. (2010). RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC Bioinformatics*. 11, 129.
 - Rivera-Bustamante, R. F.; Gin, R. y 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(1), 91–95. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90159-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90159-4)

- Roistacher, C. N. (1991). Graft-transmissible diseases of citrus, hand book for detection and diagnosis. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 280.
- Roistacher, C. N.; Canton, H. y Reddy, P. S. (1996). The Economics of living with citrus viroids in Belize. International Organization of Citrus Virologists (IOCV).
- Sano, T.; Candresse, T.; Hammond, R. W.; Diener, T. O. y Owens, R. A. (1992). Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 89(21), 10104–10108. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.21.10104>
- Sano, T.; Uyeda, I.; Shikata, E.; Ohno, T. y Okada, Y. (1984). Nucleotide sequence of cucumber pale fruit viroid: homology to hop stunt viroid. Nucleic Acids Res., 12(8): 3427-34. <https://doi.org/10.1093/nar/12.8.3427>
- Sasaki, M. y Shikata, E. (1977a). Studies on the Host Range of Hop Stunt Disease in Japan. Proc. Japan Acad., 53, Ser. B, 103-108.
- Sasaki, M. y Shikata, E. (1977b). On Some Properties of Hop Stunt Disease Agent, a Viroid. Proc. Japan Acad., 53, Ser. B, 109-112.
- Schumacher, J.; Randles, J. W. y Riesner, D. (1983). A two-dimensional electrophoretic technique for the detection of circular viroids and virusoids. Analytical Biochemistry, 135(2), 288–295. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(83\)90685-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(83)90685-1)
- Semancik, J. S.; Rakowski, A. G.; Bash, J. A. y Gumpf, D. J. (1997). Application of selected viroids for dwarfing and enhancement of production of “Valencia” orange. Journal of Horticultural Science, 72(4), 563–570. <https://doi.org/10.1080/14620316.1997.11515544>
- SENASA 2022. Artículo de divulgación “Calidad y sanidad para potenciar la productividad de la citricultura argentina”. Disponible en <https://www.argentina.gob.ar/noticias/calidad-y-sanidad-para-potenciar-la-productividad-de-la-citricultura-argentina>
- Serra, P. (2009). Género *Apscaviroid* y *Hostuviroid* en cítricos. Tesis doctoral dirigida por Nuria Durán-Vila Valencia 2009.
- Serra, P.; Eiras, M.; Bani-Hashemian, S. M.; Murcia, N.; Kitajima, E. W.; Daròs, J. A.; Flores, R. y Duran-Vila, N. (2008). Citrus viroid V: Occurrence, host range, diagnosis, and identification of new variants. *Phytopathology*, 98(11), 1199–1204. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1199>
- Steger, G. y Riesner, D. (2018). Viroid research and its significance for RNA technology and basic biochemistry. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 46, Issue 20, pp. 10563–10576). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/nar/gky903>
- Tessitori, M. (2017). Chapter 23: Apscaviroids Infecting Citrus Trees. In *Viroids and Satellites*, 243-249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00023-1>
- Tessitori, M.; Rizza, S.; Reina, A.; Causarano, G. y di Serio, F. (2013). The genetic diversity of Citrus dwarfing viroid populations is mainly dependent on the infected host species. *Journal of General Virology*, 94(PART3), 687–693. <https://doi.org/10.1099/vir.0.048025-0>
- Treiber, T.; Treiber, N. y Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 20, 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Umaña Castro, R. (2010). Diagnóstico de CBCVd (*Cocadviroide*) y CVd-VI (*Apscaviroide*) en plantaciones cítricas del Uruguay mediante técnicas de detección basadas en hibridación molecular no isotópica. Tesis magíster.

- Van Dorst, H. J. M. y Peters, D. (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Neth. J. Pl. Path.* 80, 85-96.
- van Dorst, H.J.M. y Peters, D. (1974). Some biological observations on pale fruit, a viroid-incited disease of cucumber. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 80, 85–96. <https://doi.org/10.1007/BF01980613>
- Vernière, C.; Perrier, X.; Dubois, C.; Dubois, A.; Botella, L.; Chabrier, C. y Duran-Vila, N. (2006). Interactions between Citrus viroids affect symptom expression and field performance of Clementine trees grafted on trifoliolate orange. *Phytopathology*, 96(4), 356–368. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0356>
- Visvader, J. E. y Symons, R. H. (1985). Eleven new sequence variants of citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity. *Nucleic Acids Research*, 13(8), 2907–2920.
- Wang, J.; Mei, J. y Ren, G. (2019). Plant microRNAs: Biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*, 10 (March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>
- 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. y 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*, 101(9), 3275–3280. <https://doi:10.1073/pnas.0400104101>
- Zhu, L.; Ow, D. W. y Dong, Z. (2018). Transfer RNA-derived small RNAs in plants. *Sci. China Life Sci.* 61, 155–161. <https://doi: 10.1007/s11427-017-9167-5>
- Zhu, S.; Zhang, Y.; Tiberini, A. y Barba, M. (2017). Detection and Identification of Viroids by Microarrays. In *Viroids and Satellites*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801498-1.00037-1>
- Zhang, Y.; Yin, J.; Jiang, D.; Xin, Y.; Ding, F.; Deng, Z.; Wang, G.; Ma, X.; Li, F.; Li, G.; Li, M.; Li, S. y Zhu, S. (2013). A Universal Oligonucleotide Microarray with a Minimal Number of Probes for the Detection and Identification of Viroids at the Genus Level. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064474>
- Agindotan, B. y Perry, K. L. (2008). Macroarray detection of eleven potato-infecting viruses and Potato spindle tuber viroid. *Plant Disease*, 92(5), 730–740. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-5-0730>
- Tiberini, A. y Barba, M. (2012). Optimization and improvement of oligonucleotide microarray-based detection of tomato viruses and pospiviroids. In *Journal of Virological Methods*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0166093412001966>

ANEXO I

Plantas de naranjo (*Citrus sinensis*) desde las que se obtuvieron las muestras para la identificación de viroides de cítricos.

A continuación, se presentan fotos de cada árbol de campo del que se tomaron las muestras para este trabajo.



Figura 71: copa (A) y pie (B) del naranjo del cual se tomó la muestra M25.



Figura 72: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza en el pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M26.



Figura 73: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M27.



Figura 74: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M28.



Figura 75: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M29.



Figura 76: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M30.



Figura 77: copa (A) y pie(B) de naranjo del cual se tomó la muestra31.



Figura 78: copa (A), el pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M32.



Figura 79: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M33.



Figura 80: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M34.



Figura 81: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M35.



Figura 82: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M36.



Figura 83: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M37.



Figura 84: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M38.



Figura 85: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M39.



Figura 86: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M40.



Figura 87: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M41.



Figura 88: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M42.



Figura 89: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M43.



Figura 90: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M44.



Figura 91: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M45.

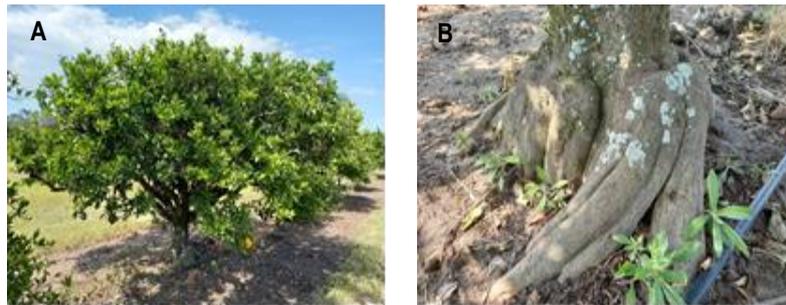


Figura 92: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M46.



Figura 93: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M47.



Figura 94: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M48.



Figura 95: copa (A) y pie (B) de naranjo del cual se tomó la muestra M49.



Figura 96: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M50.



Figura 97: copa (A), pie (B) y debajo de la corteza del pie (C) del naranjo desde el cual se tomó la muestra M51.

ANEXO II
Síntomas observados en cidra Etrog causados por viroides, y su
escala de severidad.

En este anexo, se describe los principales síntomas que se observan en las plantas de cidra *Eurog* inoculadas con muestras que contienen viroides, y sus distintos niveles de expresión. Hay que aclarar que, para la clasificación de las muestras, no sólo se tiene en cuenta el síntoma y su intensidad, sino el grado de afección de la planta en su totalidad.



Figura 98: Epinastia de hojas

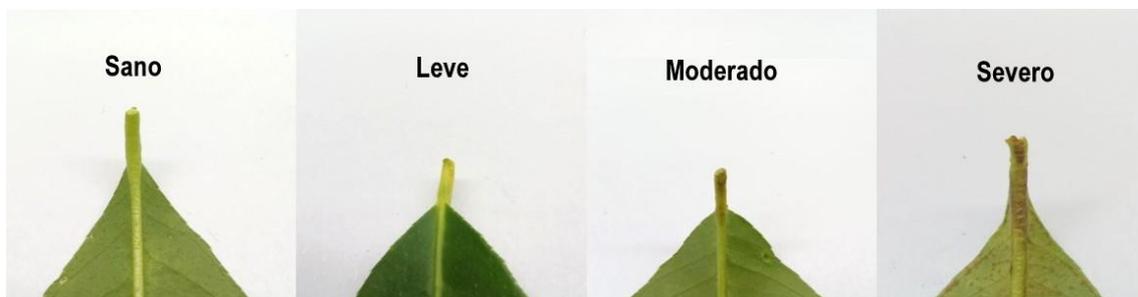


Figura 99: Amarramiento de peciolo

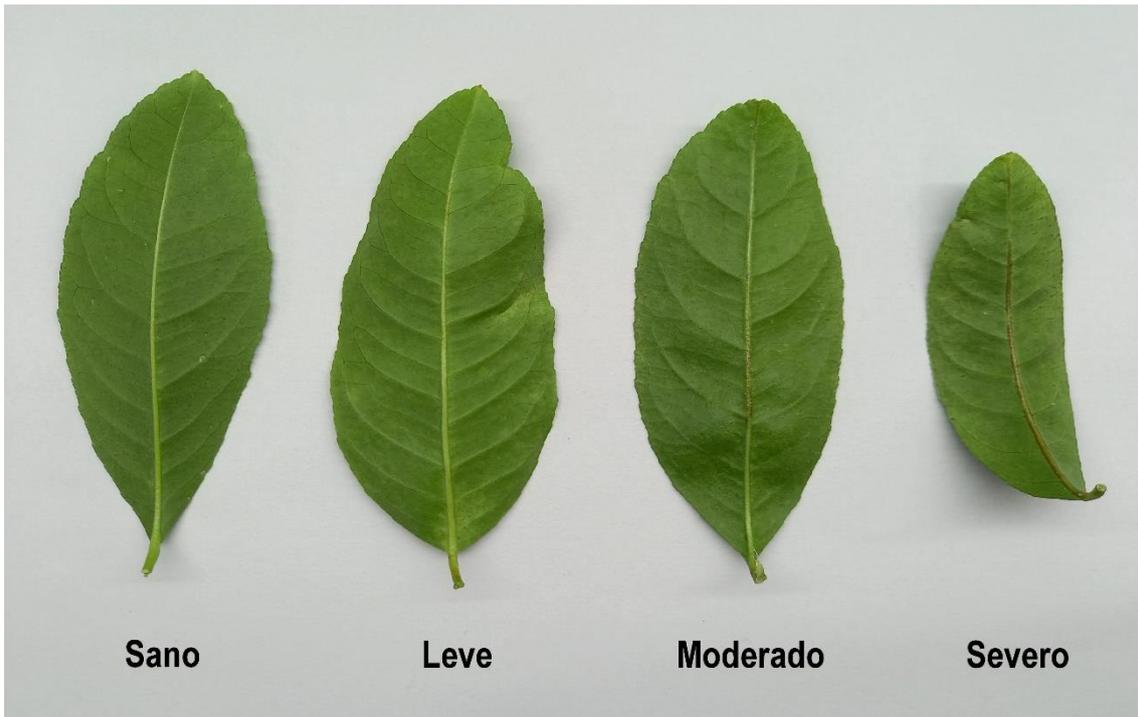


Figura 100: Amarronamiento de nervadura central

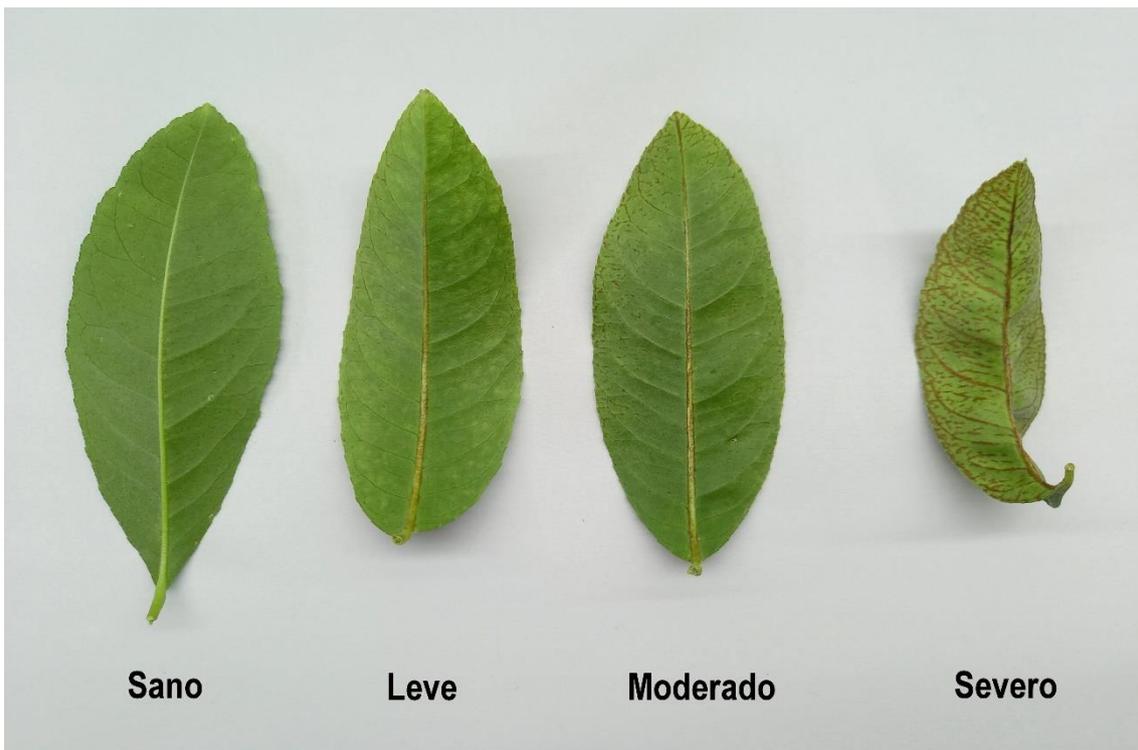


Figura 101: Amarronamiento nervaduras secundarias



Figura 102: Acumulación de goma debajo de la corteza



Figura 103: Enanismo y/o retraso del crecimiento.

ANEXO III
**Sintomatología y fotos de plantines de cidra Etrog inoculados con
muestras de campo a distintos tiempos**

En la Tabla 29 se presenta la sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog a los 5 meses desde la fecha de inoculación.

Muestra	Síntomas					
	Epinastia	Amarronamiento peciolos	A. nervadura central	A. nervadura secundaria	Acumulación de goma debajo de la corteza	Retraso del crecimiento
M25	-	-	-	-	-	-
M26	+	++	+	-	+	-
M27	++	++	+	-	+/>++	-
M28	+	++	+	-	++	-
M29	+	+/>++	-	-	+	-
M30	+	+/>++	-	-	+	-
M31	+/>++	++/>+++	+	-	+	-
M32	+/>++	++/>+++	+	++	++	-
M33	+	++	+/>++	++	++	-
M34	-	-	-	-	-	-
M35	+	+/>++	+	+	+	-
M36	+	++	+	++	+	-
M37	-	-	-	-	-	-
M38*	-	-	-	-	-	-
M39	+/>++	++	+	-	+/>++	-
M40	-	-	-	-	-	-
M41	+	+	+	+	+	-
M42	+	+	+	+	+	-
M43	-	-	-	-	-	-
M44	+	++	+	+/>++	+	-
M45	+	+/>++	-	+	+	-
M46	-	-	-	-	-	-
M47	+	++	+	+	+	-
M48	+	+/>++	-	++	+/>++	-
M49	+	+/>++	-	-	+/>++	-
M50	+	+/>++	-	-	++	-
M51	+	+/>++	-	+/>++	+/>++	-

Tabla 29: sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog a los 5 meses desde la inoculación.

Clasificación de los síntomas en leve: +, moderado: ++, severo: +/+, - indica que no se observa ese síntoma.

*los plantines mostraron dobladuras de hojas raras pero que no corresponden a los reportados como síntomas de viroides.

A continuación, se muestran fotos de los 4 plantines inoculados a los 5 meses desde la inoculación. Las mismas están ordenadas de izquierda a derecha: plantín 1 (P1) – plantín 2 (P2) – plantín 3 (P3) y plantín 4 (P4) (Figuras 104 a 130).



Figura 104: Plantines inoculados con Muestra 25



Figura 105: Plantines inoculados con Muestra 26



Figura 106: Plantines inoculados con Muestra 27



Figura 107: Plantines inoculados con Muestra 28



Figura 108: Plantines inoculados con Muestra 29



Figura 109: Plantines inoculados con Muestra 30



Figura 110: Plantines inoculados con Muestra 31



Figura 111: Plantines inoculados con Muestra 32



Figura 112: Plantines inoculados con Muestra 33



Figura 113: Plantines inoculados con Muestra 34



Figura 114: Plantines inoculados con Muestra 35



Figura 115: Plantines inoculados con Muestra 36



Figura 116: Plantines inoculados con Muestra 37



Figura 117: Plantines inoculados con Muestra 38



Figura 118: Plantines inoculados con Muestra 39



Figura 119: Plantines inoculados con Muestra 40



Figura 120: Plantines inoculados con Muestra 41



Figura 121: Plantines inoculados con Muestra 42



Figura 122: Plantines inoculados con Muestra 43



Figura 123: Plantines inoculados con Muestra 44



Figura 124: Plantines inoculados con Muestra 45

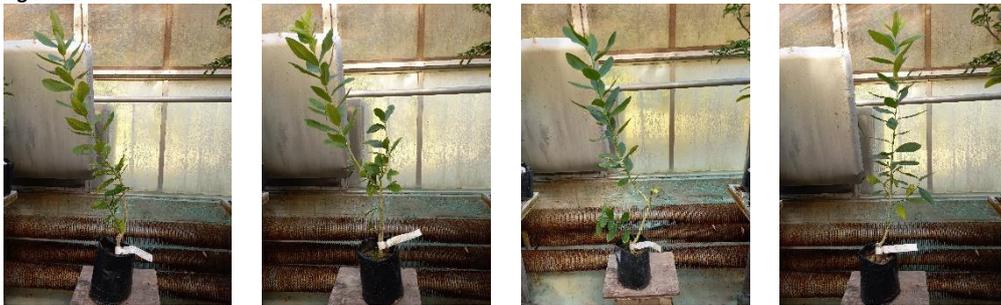


Figura 125: Plantines inoculados con Muestra 46



Figura 126: Plantines inoculados con Muestra 47



Figura 127: Plantines inoculados con Muestra 48



Figura 128: Plantines inoculados con Muestra 49



Figura 129: Plantines inoculados con Muestra 50



Figura 130: Plantines inoculados con Muestra 51

En la Tabla 30 se presenta la sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog al año desde la fecha de inoculación.

Muestra	Síntomas					
	Epinastia	Amarronamiento peciolo	A. nervadura central	A. nervadura secundaria	Acumulación de goma debajo de la corteza	Retraso de crecimiento
M25	-	-	-	-	-	-
M26	+	++	+	+	+	+
M27	++	++	+	-	+/++	+
M28	+	++	+	-	++	+
M29	+	++	-	-	+	-
M30	+	++	+	-	+	-
M31	+/++	++/+++	+	-	+	+
M32	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M33	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M34	-	-	-	-	-	-
M35	+	+/++	+	+	+	+
M36	+++	++	+++	++	+++	+++
M37	-	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-	-
M39	+/++	++	+	-	+/++	+
M40	-	-	-	-	-	-
M41	+++	+	+	+	++	++
M42	+++	+	+	+	++	++
M43	-	-	-	-	-	-
M44	+++	++	++	++	++	+++
M45	++	++	++	++	++	+++
M46	-	-	-	-	-	-
M47	+++	++	++	++	++	+++
M48	+++	++	+	++	++	++
M49	+	+/++	-	-	+	-
M50	+	+/++	-	-	++	+
M51	+++	++	+	++	++	++

Tabla 30: sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog al año desde la inoculación (La presente tabla es un duplicado de la Tabla 6 en el Capítulo 1).

A continuación, se muestran fotos de los 4 plantines inoculados al año desde la fecha de inoculación. En las fotos los plantines se encuentran ordenados de izquierda a derecha: plantín 1 (P1) – plantín 2 (P2) – plantín 3 (P3) y plantín 4 (P4) (Figuras 131 a 156).



Figura 131: plantines inoculados con Muestra 25



Figura 132: plantines inoculados con Muestra 26



Figura 133: plantines inoculados con Muestra 27



Figura 134: plantines inoculados con Muestra 28



Figura 135: plantines inoculados con Muestra 29



Figura 136: plantines inoculados con Muestra 30



Figura 137: plantines inoculados con Muestra 31



Figura 138: plantines inoculados con Muestra 32



Figura 139: plantines inoculados con Muestra 33



Figura 140: plantines inoculados con Muestra 34



Figura 141: plantines inoculados con Muestra 35



Figura 142: plantines inoculados con Muestra 36



Figura 143: plantines inoculados con Muestra 37



Figura 144: plantines inoculados con Muestra 39



Figura 145: plantines inoculados con Muestra 40



Figura 146: plantines inoculados con Muestra 41



Figura 147: plantines inoculados con Muestra 42



Figura 148: plantines inoculados con Muestra 43



Figura 149: plantines inoculados con Muestra 44



Figura 150: plantines inoculados con Muestra 45



Figura 151: plantines inoculados con Muestra 46



Figura 152: plantines inoculados con Muestra 47



Figura 153: plantines inoculados con Muestra 48



Figura 154: plantines inoculados con Muestra 49



Figura 155: plantines inoculados con Muestra 50



Figura 156: plantines inoculados con Muestra 51

En la Tabla 31 se presenta la sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog a los 2 años desde la fecha de inoculación.

Muestra	Síntomas					
	Epinastia	Amarronamiento peciolo	A. nervadura central	A. nervadura secundaria	Acumulación de goma debajo de la corteza	Retraso del crecimiento
M25	-	-	-	-	-	-
M26	+	++	+	+	+	+
M27	++	++	+	-	++	+
M28	+	++	+	-	++	+
M29	+	++	+	-	+	+
M30	+	++	+	+	+	+
M31	+/++	++/+++	+	-	+	++
M32	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M33	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M34	-	-	-	-	-	-
M35	+	++	+	+	+	+
M36	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M37	-	-	-	-	-	-
M38	-	-	-	-	-	-
M39	+/+++	++	+	-	+/+++	+
M40	-	-	-	-	-	-
M41	+++	++/+++	++/+++	++	+++	+++
M42	+++	++/+++	++/+++	++	+++	++
M43	-	-	-	-	-	-
M44	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M45	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M46	-	-	-	-	-	-
M47	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M48	+++	+++	+++	+++	+++	+++
M49	+	+/+++	+	+	+	+
M50	+	+++	++	+	++	++
M51	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Tabla 31: Sintomatología observada en los plantines de cidra Etrog a los 2 años desde la inoculación.

A continuación, se muestran fotos de los 4 plantines inoculados a los **dos años** desde la fecha de inoculación. En las fotos los plantines se encuentran ordenados de izquierda a derecha: plantín 1 (P1) – plantín 2 (P2) – plantín 3 (P3) y plantín 4 (P4) (Figuras 157 a 183).



Figura 157: plantines inoculados con Muestra 25



Figura 158: plantines inoculados con Muestra 26



Figura 159: plantines inoculados con Muestra 27



Figura 160: plantines inoculados con Muestra 28



Figura 161: plantines inoculados con Muestra 29



Figura 162: plantines inoculados con Muestra 30



Figura 163: plantines inoculados con Muestra 31



Figura 164: plantines inoculados con Muestra 32. El plantín nº3 se eliminó porque murió.



Figura 165: plantines inoculados con Muestra 33. El plantín nº2 se eliminó porque murió, y el plantín nº3 también murió.



Figura 166: plantines inoculados con Muestra 34



Figura 167: plantines inoculados con Muestra 35



Figura 168: plantines inoculados con Muestra 36



Figura 169: plantines inoculados con Muestra 37



Figura170: plantines inoculados con Muestra 38



Figura 171: plantines inoculados con Muestra 39



Figura 172: plantines inoculados con Muestra 40



Figura 173: plantines inoculados con Muestra 41



Figura 174: plantines inoculados con Muestra 42



Figura 175: plantines inoculados con Muestra 43



Figura 176: plantines inoculados con Muestra 44



Figura 177: plantines inoculados con Muestra 45



Figura 178: plantines inoculados con Muestra 46



Figura 179: plantines inoculados con Muestra 47



Figura 180: plantines inoculados con Muestra 48



Figura 181: plantines inoculados con Muestra 49



Figura 182: plantines inoculados con Muestra 50



Figura 183: plantines inoculados con Muestra 51

ANEXO IV

Estructuras secundarias de los viroides identificados en este trabajo y de las secuencias reportadas que se utilizaron como referencia

La enumeración de los distintos *loops* se realizó a partir de las estructuras secundarias obtenidas para cada aislamiento de viroides, utilizando la conformación de varilla y comenzando por el extremo izquierdo.

Citrus Exocortis viroid (CEVd)

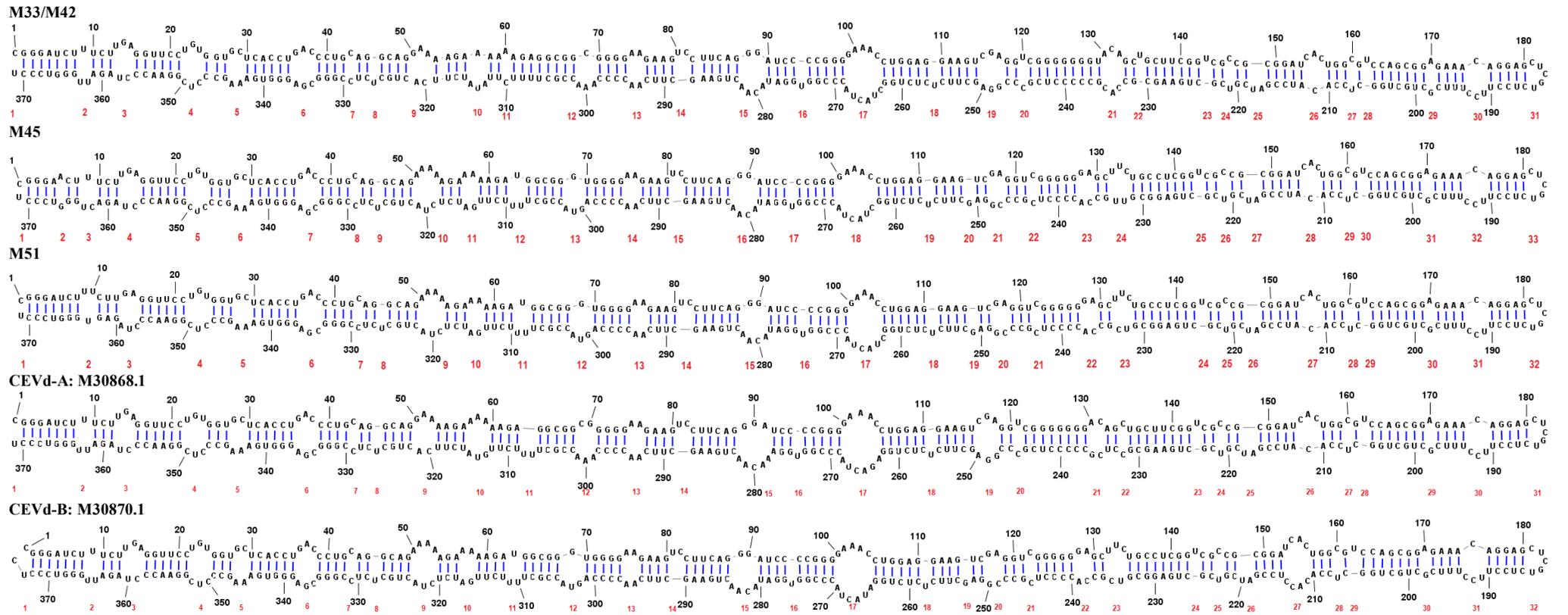


Figura 184: Conformaciones secundarias predichas con el programa *RNA structure* para aislamientos de CEVd identificados en este trabajo y otras secuencias reportadas de este viroide. Con números rojos se enumeran los *loops*.

Hop stunt viroid (HSVd)

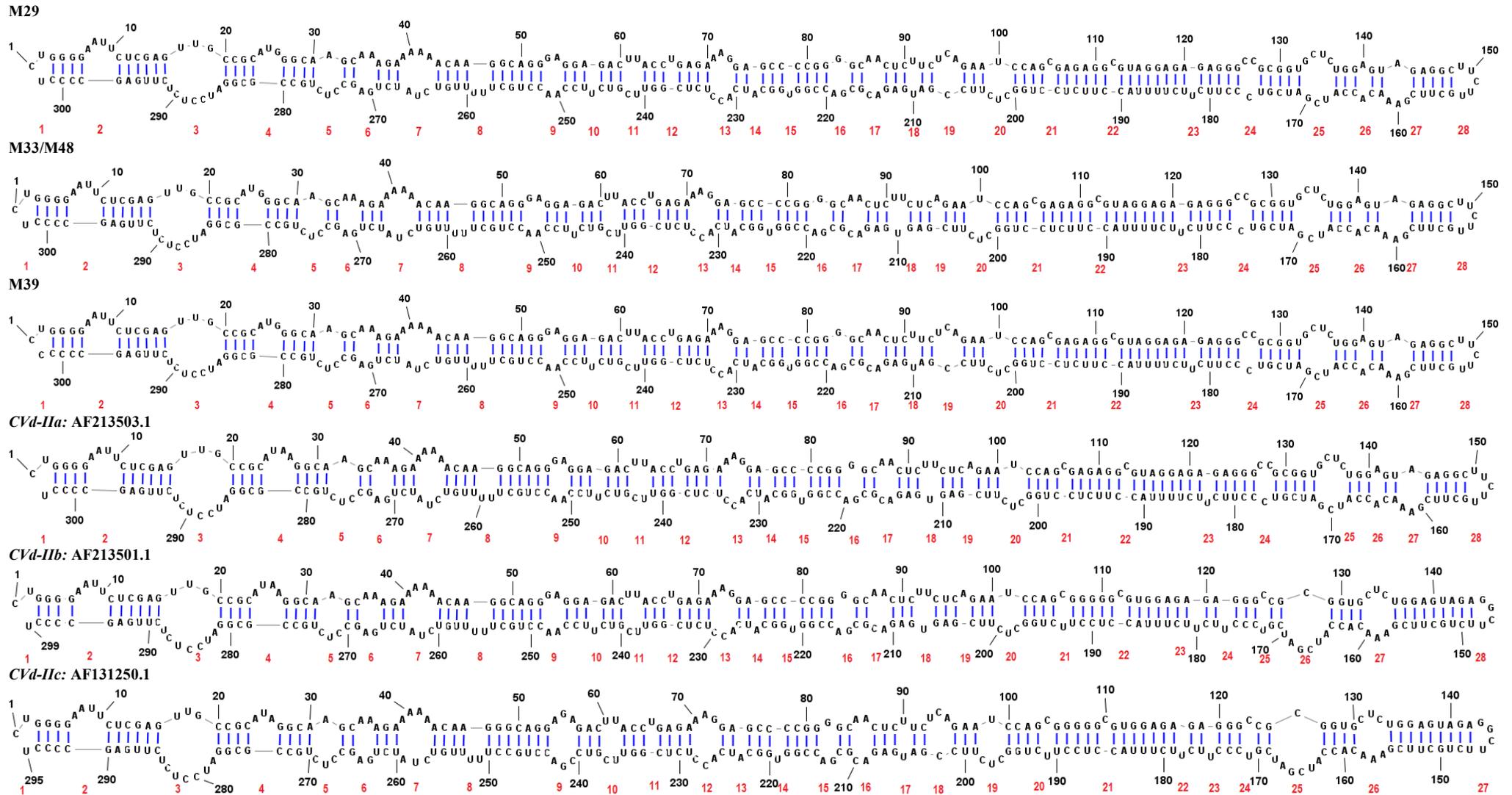


Figura 185: Conformaciones secundarias predichas con el programa *RNA structure* para aislamientos de HSVd identificados en este trabajo y otras secuencias reportadas de este viroide. Con números rojos se enumeran los *loops*.

Citrus dwarfing viroid (CDVd)

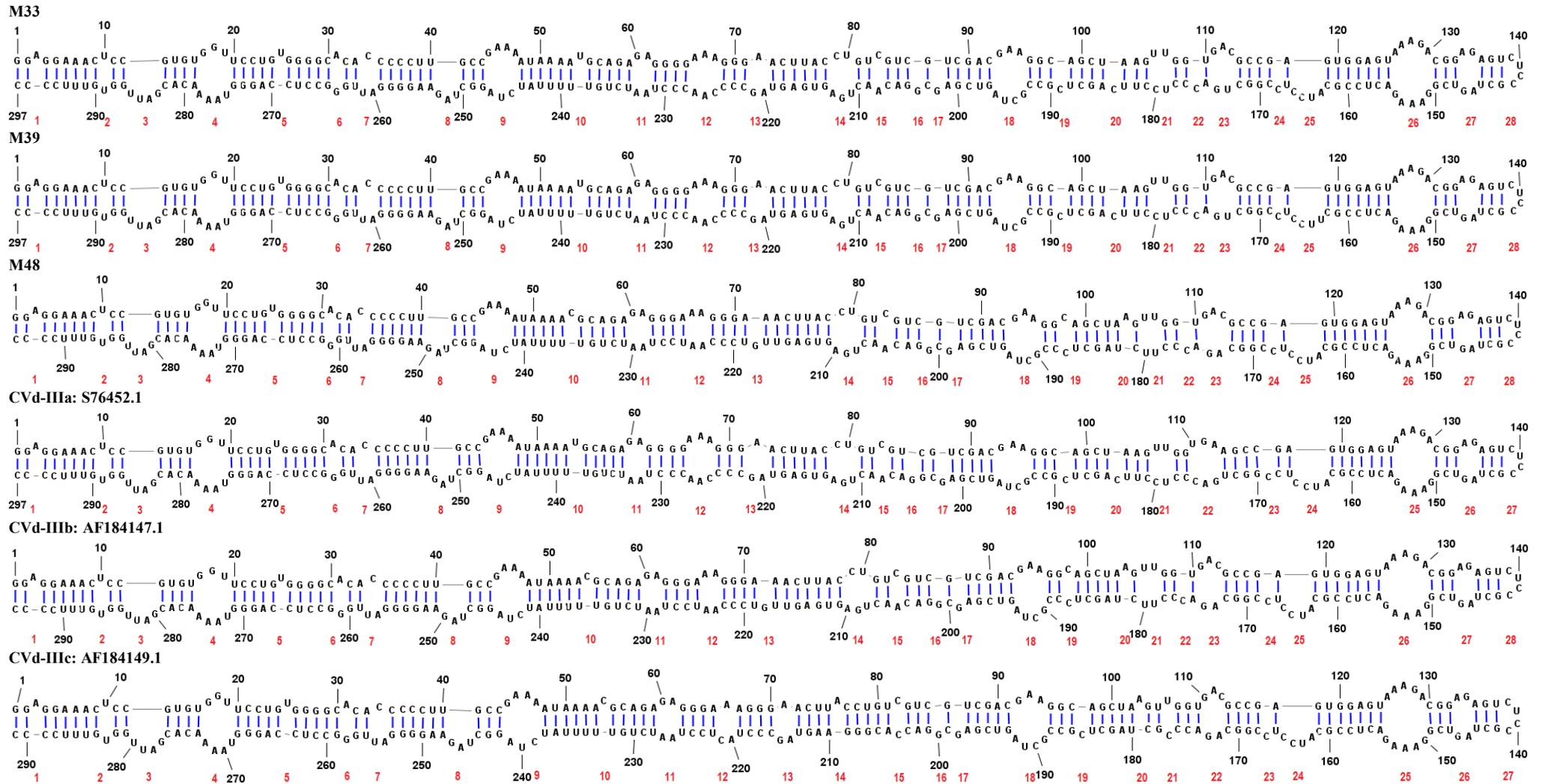


Figura 186: Conformaciones secundarias predichas con el programa *RNA structure* para aislamientos de CDVd identificados en este trabajo y otras secuencias reportadas de este viroide. Con números rojos se enumeran los *loops*.

ANEXO V

**Reactivos y condiciones de las reacciones de RT-qPCR para los distintos viroides
y los controles internos**

RT-qPCR para CEVd y condiciones de cicladoMolde: 50ng de RNA

Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer CEVd-F4 (10uM)	0,3uM	0.3
Primer CEVd-R1 (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner en hielo 5min		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	58°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
1 ciclo	95°C	15seg
1 ciclo	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para HSVd y condiciones de ciclado

Molde: 100ng de RNA

Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer HSVd-RT (10uM)	0.2uM	0.2
Primer HSVd-F1 (10uM)	0.2uM	0.2
Primer HSVd-R1 (10uM)	0.2uM	0.2
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	58°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
1 ciclo	95°C	15seg
1 ciclo	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para CDVd y condiciones de ciclado

Molde: 20ng de RNA

Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer CDVd-F3 (10uM)	0,3uM	0.3
Primer CDVd-R1 (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	57°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
1 ciclo	95°C	15seg
1 ciclo	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para CBLVd y condiciones de ciclado

Molde: 200ng de RNA

Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer CBLVd-F1 (10uM)	0,3uM	0.3
Primer CBLVd-R1 (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	62°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
1 ciclo	95°C	15seg
1 ciclo	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para CBCVd y condiciones de ciclado

Molde: 200ng de RNA

Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer CBCVd-F3 (10uM)	0,3uM	0.3
Primer CBCVd-R1 (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	57°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
1 ciclo	95°C	15seg
1 ciclo	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para Ubiquitina (control interno) y condiciones de ciclado

Molde: 100ng de RNA

Ubiquitina		
Reactivo	Cf	x1 (μl)
H ₂ O		3.28
Primer Ubqt1-F (10uM)	0,3uM	0.3
Primer Ubqt2-R (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT -qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	58°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
	95°C	15seg
	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		

RT-qPCR para Citocromo oxidasa (control interno) y condiciones de ciclado

Molde: 100ng de RNA

Citocromo oxidasa		
Reactivo	Cf	x1 (µl)
H ₂ O		3.28
Primer COX-F (10uM)	0,3uM	0.3
Primer COX-R (10uM)	0,3uM	0.3
Molde		1
Subtotal		4.88
Incubar a 80°C por 10min, y luego poner 5min en hielo		
iTaq universal MIX (BIORAD)	2x	5
Transcriptasa reversa	-	0.125
Total		10

Programa RT-qPCR		
Retrotranscripción		
1 ciclo	50°C	30min
Amplificación		
1 ciclo	95°C	5min
40 ciclos	95°C	10seg
	58°C	30seg
	72°C	30seg
Curva Melting		
	95°C	15seg
	60°C	15seg
Curva entre 60-95°C		
Tiempo de la rampa 20min		
Se mide la fluorescencia constantemente		