Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria
Dirección Protección de Plantas
Laboratorio de Virología Vegetal

Tesis en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Biológicas

Caracterización molecular de variantes de secuencias del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd)

Marianela Soto Méndez

CENSA
La Habana
2005

Agradecimientos

Se convierte esta página en un momento de reflexión, en el que el presente no puede saborearse honestamente si no se mira hacia atrás. Entonces, los rostros de amigos, compañeros, conocidos… se nos presentan como la huella ineludible de la compañía en el camino.

Este documento, que resume el trabajo realizado durante años y que a pesar de llevar sólo el nombre de un autor, es el resultado de la colaboración de muchas personas que han estado presentes, unas desde el punto de vista científico, otras con un poco más de espiritualidad, pero igual, los aportes de todas han sido esenciales. A ellas me dirijo, en señal de agradecimiento:

A la Dra. Lien González, tutora y amiga, o viceversa, le agradezco el empeño y entrega en este recorrido, los días y noches frente a la computadora, el café… , la certeza de su presencia y conocimientos.

A la Dra. Esther Lilia Peralta, porque aún sin proponérselo ha sido una guía innegable, y me ha abierto sus puertas en los momentos más críticos. Le agradezco todo el tiempo y esfuerzo dedicados durante la organización y elaboración de este documento.

A la Dra. Nuria Duran-Vila y su grupo (IVIA, España), por haber permitido tan cordialmente la ejecución de importantes etapas de trabajo en su laboratorio, tiempo en el cual puso a nuestra disposición sus conocimientos y recursos. Tanto a ella como al Dr. Ricardo Flores (Universidad Politécnica de Valencia) les agradezco además por la revisión del documento.

Por las oponencias realizadas a este texto, y que contribuyeron a su mejoramiento, le agradezco a los Drs. Ariel Arencibia (INICA), Miguel Ramos (facultad de Biología) y especialmente a Heydi Díaz-de Arce (CENSA), cuyos criterios han sido extremadamente valiosos; asimismo, a los miembros del consejo científico de la facultad de Biología.

Al Dr. Romualdo Pérez (UCTB Jagüey Grande) por poner a nuestra disposición, incondicionalmente, sus plantas y conocimiento; al Dr. Faure (CENSA) por su exquisita y meticulosa ayuda en un momento crucial.

A Bertica, por el trabajo técnico realizado, y por las charlas durante la inoculación y procesamiento de las plantas, que hicieron más llevaderos los días y horas que pudieron ser de hastío.

A la Dra. Yamila Martínez, por el apoyo humano y técnico brindado este tiempo, sus opiniones han sido de gran valor durante la elaboración del documento; a la Dra. Madelaine Quiñones (Made), por sus comentarios respecto a varios de los eventos relacionados con el trabajo; a la Dra. Ileana Miranda, por el tiempo dedicado a los análisis estadísticos.

A la Dra. Yaima Arocha, por sus oportunas y acertadas opiniones, por ser mi amiga, y alentarme en los momentos en los que las soluciones parecían pocas e inalcanzables; a Yenne, por su *preocupación y ocupación* justo en el momento necesario; a mis compañeras de laboratorio, Yudilay, María, Teresa, por la complicidad de estos tiempos tormentosos.

A todos los compañeros del CENSA, por las miradas y preguntas cruzadas por los pasillos.

A mi familia, por el apoyo y exigencia de siempre, por enseñarme el valor y fortaleza del amor a quienes nos pertenecen, que logra hacer propios los embates de todos; a Mercy y Arturo, por haber suplido un poco como padres durante este tiempo, cuya compañía me ha hecho olvidar a ratos, cuán lejos están otros.

Y a mis imprescindibles ausentes… (mi mamá, mi hermano, Arturo…) sus soledades, de tan leves, me son insoportables, pero he sabido imponerme el peso de sus miradas sobre mí.

La autora

SÍNTESIS

Los viroides son las entidades fitopatogénicas más simples descritas hasta el momento, capaces de causar enfermedades que pueden ocasionar cuantiosas pérdidas en un grupo importante de cultivos. De ellos, el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd), presenta la gama más amplia de hospedantes y es el agente causal de la cachexia de los cítricos. Los objetivos de este trabajo han estado encaminados al análisis de secuencias y predicciones de estructuras secundarias de este viroide de dos aislados cubanos y de otras regiones geográficas registrados en la base de datos de ARNs sub-virales, así como a desarrollar nuevas estrategias para la diferenciación de las variantes cítricas no patogénicas (CVd-IIa) y patogénicas (CVd-IIb) y para su detección. Se evidenció la variabilidad de las poblaciones de dos aislados cubanos del HSVd en cítricos mediante análisis del polimorfismo conformacional de cadenas simples de ácido desoxirribonucleico (ADN) y secuenciación, con lo que se identificaron nuevas variantes de este viroide. En el dominio patogénico se identificó una co-varación involucrada en la conservación de un bucle en la cadena inferior del ácido ribonucleico (ARN) lo que sugiere la participación de esta estructura en funciones básicas durante la infección. Se mostró que la ausencia de al menos uno de los cambios descritos en la literatura en la secuencia motivo de las variantes causantes de cachexia fue suficiente para que no se manifestara la enfermedad. Por otra parte, se evidenció el efecto de selección de la especie hospedante sobre la secuencia motivo que define el carácter inductor o no de cachexia en el aislado patogénico PM 26-X y se determinó que las cuatro variantes diferentes del HSVd evaluadas fueron capaces de replicarse y diseminarse en las plantas de pepino, sin ocasionar síntomas visibles. El retardo en la detección del HSVd en las plantas inoculadas con la variante 26x-c45 se asoció a las diferencias en el dominio patogénico que presentó con respecto a la secuencia maestra. La predicción de las conformaciones de las estructuras secundarias por dominios y sus tendencias en cuanto a la adopción de grupos específicos según el hospedante de origen permitieron proponer un agrupamiento de las variantes de este viroide informadas en la base de datos de ARNs sub-virales atendiendo a las estructuras secundarias predichas en los dominios patogénico y variable. Se diseñó una estrategia para la diferenciación de variantes cítricas del HSVd mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa basada en la secuencia motivo que define el carácter de patogenicidad, la cual se evaluó con ensayos de laboratorio e *in silico* (PCR electrónica). Se obtuvo una metodología para el diagnóstico del HSVd en plantas cítricas provenientes de campo en la que se combina la amplificación biológica intermedia en plantas de pepino y la detección mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Esta metodología presentó una eficacia de un 98.9% y requirió un tiempo de replicación del viroide en la planta de 14 días, inferior al empleado actualmente.

TABLA DE CONTENIDO

1.	**INTRODUCCIÓN**.....	1
2.	**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**.....	7
2.1.	Antecedentes y concepto de viroides.....	7
2.2.	Características de los viroides como agentes fitopatogénicos.....	9
	2.2.1. Clasificación.....	9
	2.2.2. Estructura molecular.....	9
	2.2.2.1. Estructura primaria.....	9
	2.2.2.2. Estructura secundaria.....	10
	2.2.2.3. Conformaciones funcionales.....	13
	2.2.3. Características de las poblaciones.....	15
	2.2.4. Aspectos biológicos.....	16
	2.2.4.1. Síntomas macroscópicos de las enfermedades ocasionadas por viroides y efectos citopáticos	16
	2.2.4.2. Movimiento en la planta	16
	2.2.4.3. Transmisión y Epidemiología.....	17
	2.2.4.4. Interferencia entre viroides	18
	2.2.4.5. Modelos de replicación.....	19
	2.2.4.6. Mecanismos de patogénesis.....	22
	2.2.4.6.1. Efectos de los viroides sobre las proteínas de las Células hospedantes.....	23
	2.2.4.6.2. Silenciamiento post-transcripcional de genes.....	24
2.3.	Viroides en cítricos.....	24 25
	2.3.1. La cachexia de los cítricos.....	25
	2.3.1.1. Antecedentes.....	26
	2.3.1.2. Descripción molecular y aspectos de caracterización.....	28
	2.3.2. Métodos de detección.....	32
	2.3.3. Control de las enfermedades causadas por viroides	33
3.	**MATERIALES Y MÉTODOS**.....	
3.1.	Análisis de secuencias y predicción de estructuras secundarias de variantes del HSVd	33
	3.1.1. Caracterización molecular de variantes del HSVd presentes en dos aislados de cítricos cubanos	33
	3.1.1.1. Análisis del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (SSCP)	34 36

	3.1.1.2. Análisis de secuencias	37
	3.1.2. Predicción y análisis de estructuras secundarias.....	
	3.1.2.1. Análisis de estructuras secundarias predichas en variantes del HSVd de dos aislados de cítricos cubanos	37
	3.1.2.2. Identificación de grupos conformacionales por dominios en las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd informadas en base de datos	37
3.2.	Relación entre cambios en la molécula del HSVd y la replicación y movimiento del viroide en plantas de pepino	38 41
3.3.	Detección diferencial y diagnóstico de variantes cítricas del HSVd.....	41
	3.3.1. Diferenciación de variantes patogénicas o no mediante RT-PCR.....	
	3.3.2. Establecimiento de un método de diagnóstico con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio.....	43
		49
4.	**RESULTADOS**.....	
4.1.	Análisis desecuencias y predicción de estructuras secundarias de variantes del HSVd	49
	4.1.1. Caracterización molecular de variantes del HSVd presentes en dos aislados de cítricos cubanos	49
		49
	4.1.1.1. Análisis del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (SSCP)	50
	4.1.1.2. Análisis de secuencias	56
		56
	4.1.2. Predicción y análisis de estructuras secundarias.....	
	4.1.2.1. Análisis de estructuras secundarias predichas en variantes del HSVd de dos aislados de cítricos cubanos.....	57
	4.1.2.2 Identificación de grupos conformacionales por dominios en las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd informadas en base de datos	67 71
4.2.	Relación entre cambios en la molécula del HSVd y la replicación y movimiento del viroide en plantas de pepino	71
4.3.	Detección diferencial y diagnóstico de variantes cítricas del HSVd.....	76
	4.3.1. Diferenciación de variantes patogénicas o no mediante RT-PCR.....	
	4.3.2. Establecimiento de un método de diagnóstico con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio	83
5.	**DISCUSIÓN**.....	
5.1.	La variabilidad molecular de poblaciones del HSVd en dos aislados cítricos cubanos se comporta de manera diferente en relación al carácter patogénico	83

	y hospedante	87
5.2.	La estructura secundaria predicha para el HSVd sugiere una posible selección del hospedante	91
5.3.	El dominio patogénico (P) del HSVd pudiera estar involucrado en el movimiento y/o replicación en plantas de pepino	93
5.4.	La RT-PCR en variantes cítricas del HSVd permite su diferenciación según el carácter patogénico	96
5.5.	El empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio contribuye al diagnóstico rápido y eficaz del HSVd en cítricos	99 101
6.	**CONCLUSIONES**.....	103
7.	**RECOMENDACIONES**.....	
8.	**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....	

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los viroides son las entidades patogénicas más simples descritas hasta el momento capaces de afectar sólo a plantas superiores (Flores *et al.,* 2004). Estas moléculas están compuestas únicamente por una cadena simple de ácido ribonucleico (ARN, 246-401nt), cerrada covalentemente y con una alta complementariedad interna, lo cual determina su estructura secundaria mayoritariamente en forma de varilla (Qi *et al,* 2004). Otra de sus características excepcionales es la ausencia de marcos de lectura abiertos lo cual los clasifica como moléculas de ARN no codificantes y los convierte en la forma más elemental de parasitismo, pues dependen de los mecanismos celulares para el desarrollo de sus ciclos replicativos, incluso de la maquinaria de trascripción (Flores *et al.,* 2004). A pesar de su simplicidad, los viroides son capaces de replicarse autónomamente en células susceptibles, mostrar especificidad por el hospedante, moverse de célula a célula y a larga distancia, y son capaces de inducir efectos patogénicos específicos en sus hospedantes (Flores *et al.,* 2005). En la molécula viroidal se ha identificado la presencia de cinco dominios estructurales (Kesse y Symons, 1985) que se relacionan con funciones específicas, no obstante, estudios más recientes indican que el desempeño de un función determinada involucra a más de un dominio (Sano y Ishiguro, 1998; Palacio-Bielsa y Duran-Vila, 2000).

Uno de los elementos claves en la actividad biológica de los viroides lo constituye la estructura secundaria adoptada por las secuencias, la cual puede ser funcional o proveer de señales de unión con factores del hospedante (Tabler y Tsagris, 2004). La formación de estas estructuras está determinada, en primera instancia, por su secuencia nucleotídica y además, por factores del entorno biológico que pueden influir sobre ella. En estudios realizados por Wang *et al.* (2004) se sugiere que en la evolución de estas moléculas la estructura secundaria puede ser resultado de la presión de selección ejercida por el mecanismo de silenciamiento del ARN involucrado en el desarrollo de la patogénesis de estas entidades. Otros estudios, en los cuales se ha evidenciado el mantenimiento de determinadas conformaciones de las estructuras secundarias de los viroides y de la implicación de co-variaciones en ello, apoyan la importancia de estas en el desarrollo de sus funciones biológicas (Kofalvi *et al.,* 1997; Flores *et al.,* 2004; Tabler y Tsagris, 2004).

Las poblaciones viroidales se presentan en sus hospedantes de manera heterogénea según el modelo de *cuasiespecies,* donde coexisten una serie de secuencias con un alto porcentaje de identidad entre sí, pero con variaciones puntuales que pueden influir en la expresión de los síntomas en determinados hospedantes (Eigen, 1993). Estas variaciones están dadas, en primer lugar, por mutaciones originadas a partir del ciclo replicativo en el que participa la enzima ARN polimerasa de la planta, la cual carece de acción correctora, y su selección puede estar dada por la capacidad o aptitud de mantenerse estables en el sistema (Palacio-Bielsa, 1999; Moya *et al.,* 2000). En estudios realizados previamente con el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) (Gruner *et al.,* 1995), miembro tipo de estas entidades, y con el viroide de la exocortis de los cítricos (CEVd) (Fagoaga *et*

al., 1995; Semancik *et al.,* 1997) se evidencia que el hospedante puede ejercer selección sobre variaciones en las secuencias nucleotídicas durante el establecimiento de las poblaciones de viroides, las cuales se enmarcan en determinadas regiones de la molécula e involucran a un número limitado de nucleótidos. En estos casos se ha visto una relación entre la existencia de variaciones y el comportamiento biológico.

Se han realizado, además, otros estudios con el viroide del enanismo del lúpulo (HSVd), el cual, dentro de las especies de viroides caracterizadas hasta el presente, presenta la mayor gama de hospedantes. Este viroide ha sido descrito en varias familias y géneros de plantas (Kofalvi *et al.,* 1997) y a partir de los análisis de secuencias informadas en diferentes hospedantes se han llevado a cabo varios estudios con el objetivo de determinar la existencia de selección del hospedante sobre las secuencias nucleotídicas como una expresión de la interacción que se establece entre el ARN viroidal y elementos de la planta hospedante. En este sentido, un primer trabajo realizado por Shikata (1990) basado en el alineamiento de secuencias y Hsu *et al.* (1994) basado en las relaciones filogenéticos, condujeron al agrupamiento de las variantes existentes hasta entonces, en tres grupos. Se observó que de forma general, la mayor parte de las variantes provenientes de un mismo hospedante se ubicaron en el mismo grupo, sin embargo, conjuntamente se presentaron secuencias del HSVd a partir de otros hospedantes.

En un trabajo posterior realizado en 1997 por Kofalvi *et al.,* con un mayor número de variantes del HSVd, basados en las relaciones y distancias filogenéticas, se identificaron otros dos grupos adicionales, de manera que el agrupamiento de las secuencias del HSVd quedaron redefinidas en cinco grupos. Aunque en este reordenamiento igualmente se observó que algunas de las variantes provenientes de un mismo hospedante se ubicaron en un mismo grupo, en ninguno de los casos los grupos contuvieron a variantes provenientes de sólo un hospedante y secuencias obtenidas a partir de un hospedante se localizaron en grupos diferentes. En las variantes analizadas se identificó la presencia de cambios informativos que se relacionaron con los grupos identificados y que se ubicaron en todos los dominios de la molécula del viroide, sin embargo, el hecho de que todas las secuencias obtenidas a partir de un mismo hospedante no se agruparan de manera independiente no permitió asociarlos directamente a la selección que pudiese ejercer el hospedante sobre las variantes. No obstante, estos resultados sugieren que sobre las variaciones que muestran estas secuencias puede influir el efecto de selección del hospedante (Kofalvi *et al.,* 1997). En tal sentido, se continúa en la búsqueda de evidencias de esta selección.

El cítrico es el hospedante en el que se ha informado el mayor número de variantes de secuencias del HSVd (Pelchat *et al.,* 2003), y este constituye el agente causal de una de las enfermedades que le ocasionan pérdidas económicas de importancia a este cultivo: la cachexia de los cítricos (Duran-Vila *et al.,* 1988). En este hospedante se han descrito dos tipos de variantes de secuencia del HSVd, las cuales difieren en la capacidad de inducir los síntomas específicos de la enfermedad: variante CVd-IIa

(no patogénica) y variente CVd-IIb (patogénica). Los análisis de secuencias de estas variantes han permitido identificar una secuencia motivo que involucra a sólo cinco nucleótidos en el dominio variable de la molécula que es la responsable de las diferencias en el carácter de patogenicidad (Reanwarakorn y Semancik, 1999a; Palacio-Bielsa, 1999).

Mientras que las variantes CVd-IIb son causantes de la cachexia de los cítricos y pueden llegar a ocasionar la muerte del árbol bajo determinadas condiciones (Pérez, 2004a), las variantes CVb-IIa pueden ser empleadas para la obtención de plantas cítricas de pequeño porte vegetativo sin causar pérdidas económicas por parcela, como una medida en el manejo de este cultivo (Reanwarakorn y Semancik, 1999b). Debido a que las diferencias entre las variantes CVd-IIa y CVd-IIb involucran a un número muy reducido de nucleótidos, los métodos existentes para la identificación de ellas pueden presentar ciertas limitantes. Entre las metodologías de mayor uso se encuentran aquellas donde se emplean plantas indicadoras, lo cual requiere de tiempo, espacio y una evaluación inequívoca de los síntomas resultando esta una metodología laboriosa (Duran-Vila *et al.,* 1988; Palacio-Bielsa, 1999). Además, estas variantes pueden ser identificadas mediante la secuenciación (Palacio-Bielsa y Duran-Vila, 2004) y el empleo de sondas marcadas de manera radiactiva (Reanwarakorn y Semancik, 1999b) que resultan poco factibles para la caracterización de un elevado número de muestras o aislados.

En Cuba se ha informado la presencia del HSVd en cítricos en un alto porcentaje de plantas en diferentes zonas citrícolas (Pérez *et al.,* 1992; Velázquez *et al.,* 2002; Pérez, 2004b) y durante años el Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT) ha venido desarrollando un importante trabajo en la caracterización biológica de aislados de cítricos cubanos que contienen a este viroide (Pérez *et al.,* 1992; Pérez, 2004b); sin embargo, desde el punto molecular, no se tiene información sobre las variantes de secuencias del HSVd presentes en estos aislados. También se ha trabajado en métodos de detección basados en ensayos biológicos (Pérez *et al.,* 1992; Pérez, 2004b) y su combinación con el análisis de los ácidos nucleicos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida e hibridación de ácidos nucleicos (Velázquez, 2004). Estos métodos involucran necesariamente un paso previo de inoculación en un amplificador biológico cítrico (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999; Velázquez, 2004) a partir del cual se analizan los ácidos nucleicos, lo cual impone como limitante el requisito de al menos tres meses de incubación.

En estos momentos, la citricultura en Cuba está llevando a cabo un proceso de sustitución y diversificación de patrones de cítricos como parte de las medidas de manejo y control del complejo virus de la tristeza de los cítricos-*Toxoptera citricida*; los nuevos patrones, sin embargo, resultan en su mayoría susceptibles a las enfermedades provocadas por viroides (Rocha-Peña *et al.,* 1995; Peña *et al.,* 2004). En este sentido, la búsqueda de procedimientos rápidos y eficaces, que permitan el análisis rutinario de un gran número de muestras para su aplicación en el sistema de producción de material certificado es una de las líneas de trabajo a seguir.

Las evidencias descritas anteriormente, en cuanto a la variabilidad de las secuencias del HSVd en un amplio rango de hospedantes y la posibilidad de que tenga lugar un mecanismo de selección por parte de la planta, del cual no ha sido posible encontrar evidencias definitivas a partir del análisis de alineamientos de secuencias y relaciones filogenéticas, y además de esto, la relevancia y posible papel de la estructura secundaria de estas moléculas en el desarrollo de determinadas funciones, conducen hacia la búsqueda de selección del hospedante y otras interacciones del ARN viroidal con la planta, sustentado en la estructura secundaria. Asimismo, las diferencias de nucleótidos que discriminan a las variantes patogénicas, CVd-IIa, de las no patogénicas, CVd-IIb, pudieran emplearse para el diseño de un método que permita diferenciarlos eficientemente y de forma más factible en relación a los métodos actuales. De esta manera, se planteó la siguiente **hipótesis** de trabajo:

El conocimiento de la variabilidad molecular del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) aporta evidencias acerca de la interacción entre el ARN viroidal y el hospedante y permite la detección molecular diferenciada de variantes cítricas según la secuencia motivo asociada al carácter patogénico.

Los objetivos que condujeron el desarrollo del trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterizar molecularmente variantes del HSVd presentes en dos aislados cubanos de cítricos.
2. Determinar la relación existente entre las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd y el hospedante de origen.
3. Diseñar una estrategia para la diferenciación molecular de variantes cítricas del HSVd causantes o no de la cachexia de los cítricos.
4. Disponer de una metodología para el diagnóstico del HSVd en cítricos que supere en rapidez al existente actualmente sin detrimento de la eficacia.

La **novedad científica** de este trabajo reside en las evidencias obtenidas acerca de la selección que ejerce el hospedante sobre el establecimiento de las variantes poblacionales del HSVd, basado en la estructura secundaria. De esta manera, la identificación de determinados grupos conformacionales por dominio permitió agrupar las variantes según el hospedante de origen, aspecto de interés en el estudio molecular de los viroides. La caracterización molecular de un aislado cubano del HSVd causante de cachexia de los cítricos a partir de diferentes hospedantes, arrojó resultados que indican la selección diferencial ejercida sobre la secuencia motivo específica para variantes causantes o no de cachexia, inclusive por hospedantes relacionados desde el punto de vista filogenético (cítricos).

La secuenciación de variantes del HSVd obtenidas a partir de aislados cubanos de cítricos puso de manifiesto la existencia de variantes de secuencia no registradas internacionalmente, las cuales fueron depositadas en la base de datos *GenBank* del Centro Nacional para la Información de la

Biotecnología (NCBI), además, estas constituyeron las primeras secuencias del HSVd informadas en Cuba. Las evidencias obtenidas sobre la posible implicación del dominio patogénico en la replicación y movimiento a larga distancia de variantes del HSVd en plantas de pepino constituyen otro de los aportes científicos de este trabajo. Por otra parte, el análisis de las conformaciones de las estructuras secundarias predichas en las variantes del HSVd y la incorporación de las herramientas bioinformáticas disponibles en la actualidad permitió proponer un nuevo agrupamiento que constituye la base para estudios posteriores *in vitro* que corroboren las predicciones de las estructuras secundarias, identifiquen posibles sitios de interacción con elementos de la planta hospedante y función en la actividad biológica.

El diseño de nuevos cebadores y la optimización de las condiciones de amplificación, capaces de ser utilizados en la práctica para la diferenciación de las variantes CVd-IIa y CVd-IIb, a pesar de la elevada similitud de sus secuencias, y su evaluación frente a un gran número de las secuencias registradas internacionalmente mediante ensayos *in silico* constituye un resultado de interés, tanto desde el punto de vista científico como práctico.

La **importancia práctica** del presente trabajo radica en el diseño de cebadores dirigidos hacia la región de la secuencia motivo específica de variantes del HSVd causantes o no de cachexia –ya mencionado-, y el establecimiento de condiciones para su utilización, lo cual constituye un método que permite, de manera factible, la caracterización molecular de aislados de este viroide en cítricos y por consiguiente contribuye a la selección específica de estas variantes, ya sea dirigida a evitar la diseminación de las secuencias patogénicas o al uso estratégico de las variantes no patogénicas. Otro aspecto de gran importancia práctica es la propuesta de una metodología para el diagnóstico del HSVd en cítricos que involucra la utilización de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio el cual logra una disminución sustancial del tiempo requerido para la realización del diagnóstico y la toma de decisiones, sin detrimento de su eficacia.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antecedentes y concepto de viroides

Hacia 1962, desde el punto de vista político, el mundo estaba casi al borde del abismo: las dos naciones más pobladas, China y la India, se encontraban en guerra entre sí, y los dos países más poderosos, Estados Unidos y La Unión de Republicas Socialistas Soviéticas, habían llevado al mundo al borde de una guerra nuclear. Se celebraba entonces, una revolución pacífica en la biología con el otorgamiento del premio Nobel a los investigadores Crick, Watson y Wilkins, por el descubrimiento de la estructura de la molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN), quedaba de esta manera establecido el *dogma central* de la biología moderna, el cual se convertiría en la hipótesis de trabajo fundamental para las investigaciones de todas las entidades vivientes (Singh, 1998).

Por este mismo tiempo, esencialmente dos laboratorios (representados por Diener y Singh), estaban enfrascados en el estudio y caracterización del agente causal de la enfermedad conocida como tubérculo ahusado de la papa, sin sospechar que un día sus resultados pudieran ser mostrados para desafiar al dogma central (Singh, 1998).

Durante mucho tiempo los virus fueron considerados las entidades más simples capaces de inducir enfermedades en los organismos vivos. Se consideraba entonces, que ningún sistema que tuviese una organización inferior a estos, sería capaz de provocar daños, o sencillamente replicarse. Fue por ello que el descubrimiento, en 1971, de un nuevo genoma patogénico más simple que los ya estudiados, de tamaño muchísimo menor que el de los virus más pequeños, a los cuales se les denominó **viroides** (Symons, 1997; Diener, 1999), mantuvo a la comunidad científica con cierto escepticismo.

Los primeros trabajos dirigidos a la caracterización de estas nuevas entidades necesitaron, no tanto la implementación de técnicas novedosas, sino más bien una forma de análisis que rompiera con ciertos paradigmas establecidos, que inevitablemente condicionaban las líneas de investigación. Así, los viroides quedan descritos como las entidades infecciosas de menor complejidad genética y estructural identificadas hasta el momento. Estos están formados exclusivamente de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) desnudo, con un longitud aproximada de 246-401 nucleótidos (Flores, 2001), que se encuentra en forma de simple cadena circular cerrada covalentemente, y con un alta complementariedad interna, la cual le confiere a la molécula una apariencia de una hebra doble de ARN (Flores *et al.,* 1998) (figura 1). Estos agentes son capaces de replicarse de forma autónoma valiéndose del sistema de transcripción de la célula hospedante, representando así la forma más extrema de parasitismo, descrita hasta el momento sólo en plantas superiores (Tabler y Tsagris, 2004).

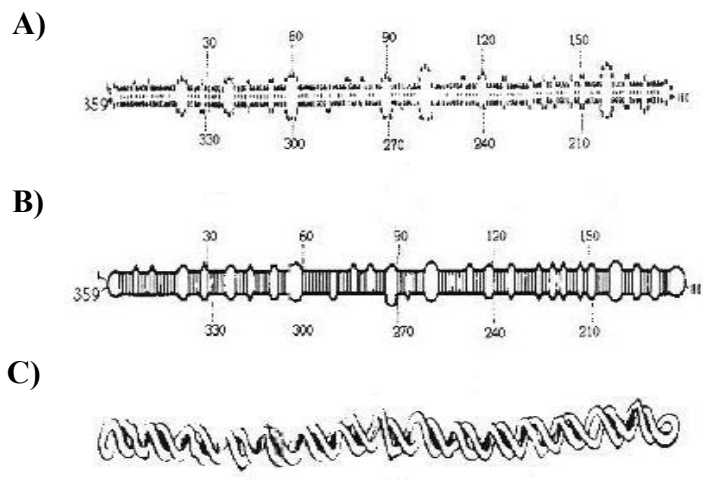


Figura 1. Estructura propuesta para el viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) por Gross *et al.*, 1978). **A)**: secuencia nucleotídica; **B)**: estructura secundaria; **C)**: representación tridimensional de la molécula.

El primer viroide identificado fue el causante del tubérculo ahusado de la papa, cuyo agente se denomina con las siglas provenientes del inglés (PSTVd) (Salazar, 1996). A este le siguieron los causantes de dos enfermedades importantes, la exocortis de los cítricos y el enanismo del crisantemo (Singh, 1998). Desde entonces, existe un gran número de cultivos donde se han informado afectaciones severas por estas entidades

Además de los viroides existen un número de ARNs con una estructura molecular y talla semejantes a estos, que aparecen junto a ARNs virales mayores dentro de la cápsida de ciertos virus de plantas (Tabler y Tsagris, 2004). En contraste con los viroides, los ARNs semejantes a ellos, no pueden replicarse autónomamente y requieren de la asistencia de un virus ayudador específico. En el caso de humanos se ha descrito el virus δ de la hepatitis humana (HDV), el cual está constituido por ARN circular, que requiere la presencia del virus de la hepatitis B como virus ayudador para su empaquetamiento y transmisión. El ARN del HDV contiene una región llamada dominio semejante a viroide que presenta similitudes con estos y con los ARNs satélites semejantes a viroides (Pelchat *et al.,* 2003).

Los estudios filogenéticos sugieren la probabilidad de la existencia de un origen ancestral común para los viroides, ARNs satélites de plantas y para el dominio semejante a viroide del virus δ de ARN de hepatitis humana. Ellos son consistentes con la hipótesis de que pueden ser "fósiles vivientes" de un mundo de ARN precelular (Hull, 2002).

2.2. Características de los viroides como agentes fitopatogénicos

Luego del descubrimiento del PSTVd, y más marcadamente en los últimos años, la lista de enfermedades atribuidas a viroides ha aumentado, por lo que se considera que entre las enfermedades que afectan a las plantas y de las cuales se desconoce aún su etiología, puedan encontrarse algunas ocasionadas por viroides (Hull 2002). La literatura actual recoge 30 especies de

viroides afectando a un número amplio de familias de plantas, donde se incluyen muchas de importancia económica como la papa y los cítricos (Flores *et al.,* 1998; 2004).

2.2.1. Clasificación

Los viroides son la única clase de patógenos subvirales que se replican autónomamente cuya estructura molecular está bien definida. Las características peculiares de estas entidades, así como las propiedades funcionales y su origen evolutivo diferente a los virus, han significado problemas específicos para su clasificación. De esta manera, el Comité Internacional para la Clasificación de Virus (ICTV) ha establecido un sistema de ordenamiento para los viroides, que parte del conocimiento de las secuencias nucleotídicas de las especies informadas, de la identificación de una secuencia central conservada (CCR) dentro de ellas y de determinadas características de los modelos de replicación (tabla 1) (Flores *et al.,* 1998).

Los datos de secuencia son el principal criterio para la identificación de especies de viroides, y el nivel arbitrario de 90% de identidad entre estas, establece claramente, en la mayoría de los casos, el borde que separa las especies de las variantes. Por su parte, la clasificación en géneros responde a la presencia y tipo de CCR y al agrupamiento observado mediante los árboles filogenéticos. Existen dos criterios que permiten agrupar a los géneros en dos familias. Uno de ellos esta relacionado con la presencia o no de la CCR y el segundo tiene en cuenta el tipo de corte de las cadenas multiméricas, que tiene lugar durante la replicación, aspecto este que será tratado más adelante. Por lo tanto, quedan establecidas dos familias. Dentro de la familia *Pospiviroidae* se distinguen cinco subfamilias las cuales están determinadas por la presencia de pequeñas regiones de nucleótidos en la CCR que muestran mayor identidad en unos géneros que en otros (Flores *et al.,* 1998).

2.2.2. Estructura molecular

2.2.2.1. Estructura primaria

El pequeño tamaño de las moléculas de ARN de los viroides, así como las disponibilidades modernas de la biotecnología, permiten que se conozca de manera completa la secuencia nucleotídica de un gran número de variantes. El cúmulo de información es bien amplio y existe una base de datos que contiene las secuencias de viroides y ARN similares a viroides la cual se publica anualmente (www.penelope.med.usher.ca/subviral, Pechalt *et al.,* 2003). La comparación de secuencias muestra que la mayor parte de los viroides contiene un porcentaje alto de bases G+C (53-60%) a excepción del ASBVd el cual es rico en A+U (62%) (Hull, 2002).

En muchos viroides se han encontrado pautas de periodicidad en la estructura primaria que parecen ser específicas de los mismos y se ha sugerido que esta peculiaridad pueda desempeñar un papel importante en la interacción del viroide con proteínas del hospedante, teniendo en cuenta que una de las características de las regiones del ADN capaces de unir proteínas es la periodicidad estructural (Palacio-Bielsa, 1999; Maniataki *et al.,* 2003)

2.2.2.2. Estructura secundaria

Como se ha descrito anteriormente los viroides se componen por una molécula de ARN monocatenaria circular, cerrada covalentemente, con un alto grado de complementariedad interna, lo cual le confiere una estructura secundaria peculiar. Dicha estructura se caracteriza por un plegamiento de la cadena, adoptando forma de varilla con pequeños bucles de secuencias desapareadas y algunas con ramificaciones (Palacio-Bielsa 1999) (figura 1). De esta manera la molécula, a pesar de ser simple cadena, adquiere algunas propiedades de los ácidos nucleicos bicatenarios. Estas peculiaridades se observan bajo condiciones no desnaturalizantes, sin embargo, las moléculas son vistas como círculos cerrados covalentemente cuando se emplean condiciones desnaturalizantes. Todas las preparaciones de viroides contienen una proporción variable de moléculas lineales (Hull, 2002).

A partir de la secuencia primaria es posible predecir la estructura secundaria que maximiza el número de bases pareadas. En el sistema de clasificación de los viroides se hace una distinción entre las familias que tiene como base, además, la adopción de determinada conformación en la estructura secundaria de la molécula. Los viroides pertenecientes a la familia *Pospiviroidae*, se caracterizan por adoptar una estructura de varilla, con regiones pareadas y no pareadas llamadas lazos. Los integrantes de la familia *Avsunviroidae* se encuentran menos estructurados. Así, la universalidad de la estructura de varilla de los viroides *in vitro* está siendo cuestionada (Di Serio *et al.,* 1996; Hull, 2002).

La predicción de la estructura secundaria mediante el análisis de secuencias se ha enriquecido por la modelación computarizada (Zuker *et al.,* 1999), de manera que incluye una colección de estructuras ramificadas como patrones de moldes subóptimos alternativos o *metaestables*. Tales estructuras pudieran estar favorecidas dentro del contexto biológico por encima de otras estructuras de mayor estabilidad termodinámica (Gultyaev *et al.,* 1998). Esto provee de un amplio rango de estructuras moleculares para la interacción potencial *in vivo,* ya sea en la replicación y/o en la interacción con el hospedante (Semancik y Duran-Vila, 1999).

Dentro de la estructura secundaria de varilla descrita para los viroides de la familia *Pospiviroidae* se ha identificado la presencia de cinco dominios estructurales a los cuales se les han asociado funciones específicas (Keese y Symons, 1985). Estudios más recientes han demostrado que la expresión de una función determinada no depende de sólo un dominio, sino de la interacción de varias partes de la molécula (Sano y Ishiguro, 1998; Palacio-Bielsa y Duran-Vila, 2000). No obstante, debido a que este modelo continúa siendo aceptado a continuación se describe la función de cada uno de los dominios descritos:

Dominio Central (C): Es el dominio más conservado. Presenta una región central conservada (CCR) que contiene dos series de nucleótidos que se mantienen en las hebras superiores e inferiores y que

están flanqueadas por dos repeticiones invertidas en la primera. La presencia de estas repeticiones en dicho dominio para viroides típicos, provoca la formación de una estructura cruciforme alternativa a la conformación de varilla, similar a la estructura alternativa descrita en el grupo de PSTVd (Liu y Symons, 1998). De acuerdo con la secuencia de los nucleótidos centrales se distinguen cinco tipos de CCR. La presencia o ausencia y el tipo de CCR se han tomado como criterio para la clasificación de los viroides (Flores *et al.,* 1998). Los miembros de la familia *Avsunviroidae* difieren marcadamente de los otros viroides en que ellos carecen de CCR y sus ARNs, de ambas polaridades, contienen ribozimas *cabeza de martillo*, por lo que adoptan una conformación compleja en su estructura secundaria (Bussiere *et al.,* 1999). Todo esto trae como consecuencia la introducción de diferencias sustanciales en algunos pasos de sus ciclos replicativos (Amari *et al.,* 2001), lo cual será discutido más adelante.

Los nucleótidos centrales de la hebra superior de la CCR y las secuencias repetidas e invertidas que los flanquean, pueden aparearse entre sí dejando separada la hebra inferior y forma una horquilla denominada horquilla I (Keese y Symons, 1987). También pueden formar una estructura palindrómica alternativa entre las hebras superiores de los dominios centrales de dos moléculas viroidales o de una molécula oligomérica, por lo que se ha propuesto su implicación en el procesamiento de multímeros intermedios en el ciclo de replicación (Diener, 1986).

El dominio C ha estado mayormente relacionado con la replicación de los viroides (Schrader *et al.,* 2003). Sin embargo, recientemente se ha informado su implicación en el desarrollo de mecanismos de patogénesis durante la infección del PSTVd en plantas de tomate (Qi y Ding, 2003).

Dominio patogénico (P): Está relacionado con la expresión de los síntomas. Estudios realizados sobre el tema demuestran que existe una correlación entre el origen del dominio P y la expresión de síntomas (Góra *et al.,* 1996).

En este dominio se ha identificado también una región moduladora de la patogénesis, que en el caso del PSTVd presenta variabilidad entre aislados de distinta agresividad. Estudios realizados en cuanto a la estabilidad térmica proponen la existencia de una correlación inversa entre la estabilidad térmica y la intensidad de síntomas (Schnölzer *et al.,* 1985; Lakshman y Tavantzis, 1993). También se ha observado que mutaciones en la región moduladora de la patogénesis no sólo afectan la estabilidad de dicha región, sino también a la de la molécula completa (Gruner *et al.,* 1995). Otras hipótesis relacionan la expresión de síntomas en PSTVd con la conformación tridimensional que adquiere la región moduladora de la patogénesis u otras secuencias específicas, más que con su estabilidad térmica (Maniataki *et al.,* 2003; Martínez de Alba *et al.,* 2003). El dominio P contiene una secuencia rica en purinas, principalmente en adenina (A), en la parte superior de la cadena y una secuencia oligomérica de uracilos (U) en la parte inferior. Esto es posible que pueda estar implicado en la patogénesis (Hull, 2002).

Dominio variable (V): Presenta alta variabilidad entre viroides diferentes o entre variantes de un mismo viroide en plantas infectadas. Estudios de infectividad indicaron que este dominio podría estar implicado en la acumulación del viroide en plantas infectadas, lo que afectaría la eficacia de la infección inicial o la replicación. Sin embargo, otros estudios mostraron que el nivel de infección era independiente del origen del dominio V (Góra *et al.,* 1996). También se relaciona al dominio V junto al P, con la modulación de la patogénesis (Shikata, 1990).

Dominios terminales izquierdo y derecho (T_L y T_R, siglas en inglés): Están implicados en la replicación del viroide mediante la interacción con la polimerasa que la cataliza y con el movimiento del viroide en la planta (Maniataki *et al.,* 2003), así como en la recombinación entre viroides diferentes (Rezaian, 1990).

Ambos dominios son regiones de muy baja o ninguna variabilidad respectivamente, lo que sugiere que deban tener un papel importante en el ciclo de vida del viroide (Amari *et al.,* 2001). Se ha sugerido recientemente que el dominio T_R se encuentra involucrado en el proceso replicativo (Sano y Ishiguro, 1998; Amari *et al*., 2001). Además, en PSTVd se observó la ausencia de infección sistémica lo cual se correspondió con tres sustituciones nucleotídicas en el lazo terminal izquierdo del dominio T_L. La estructura de horquilla en la región terminal izquierda del dominio T_L presente en el HSVd y en otros viroides pertenecientes al género *Cocadviroide,* es extremadamente conservada, lo cual refuerza la hipótesis de que puede tener un papel importante en la molécula del viroide (Flores *et al.,* 1997). En el dominio terminal izquierdo se identifica la presencia de dos regiones conservadas (TCR y TCH), las cuales pueden variar de un género a otro y a las que no se han asociado aún funciones específicas (Flores *et al.,* 2004).

En la figura 2 se muestran las principales características estructurales en las que se diferencian las dos familias de viroides.

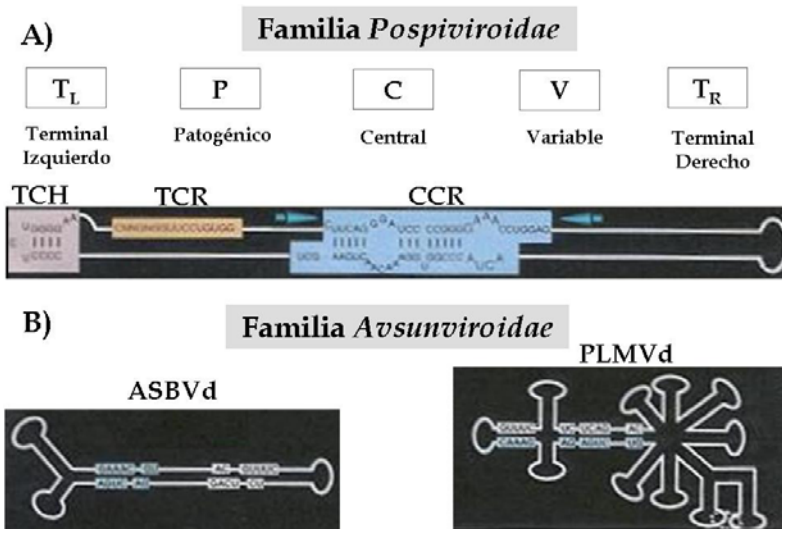


Figura 2. Estructuras secundarias de los viroides. A) Estructura secundaria de varilla propuesta para los miembros de la familia *Pospiviroidae.* Se indican los dominios estructurales T_L, P, C, V y T_R respectivamente. Se muestra la secuencia motivo de la CCR (especificada en este caso para el género Pospiviroide), TCR (presente en los géneros Pospiviroides y Apscaviroides, y en los dos miembros mayores del género Coleoviroides), TCH (presente en los géneros Hostuviroides y Cocadviroides).

Las flechas indican las secuencias flanqueadoras, que en conjunto con la cadena superior de la CCR forman repeticiones invertidas imperfectas.

2.2.2.3. Conformaciones funcionales

La cadena superior de las CCR de los cinco géneros de la familia *Pospiviroidae,* presenta tendencia a formar estructuras similares en forma de horquilla (horquilla 1), que poseen nucleótidos conservados en similares posiciones (Hull, 2002). La conformación de varilla no se ha demostrado como la adoptada por el viroide *in vivo*. Estos al ser sometidos a una desnaturalización térmica, pasan por varias transiciones estructurales y pueden adoptar otras conformaciones *metaestables* (Schrader*, et al.,* 2003). En una transición altamente cooperativa todos los apareamientos de la estructura de varilla se disocian formándose nuevos apareamientos estables en forma de horquilla (denominadas horquillas I, II y III) y, a medida que aumenta la temperatura, dichas horquillas se disocian independientemente unas de otras en función de su estabilidad térmica individual (Palacio-Bielsa 1999). En la figura 3 se describe la formación de estas horquillas enunciada para la familia *Pospiviroidae*.

Horquilla I: Se forma a causa del apareamiento de los nucleótidos centrales y las repeticiones invertidas que los flanquean de la rama superior de la CCR. Dado que pueden formarla todos los viroides que carecen de capacidad de auto-corte, se asume que debe tener un papel funcional importante, pudiendo estar implicada en el procesamiento de los precursores oligoméricos durante la replicación (Keese y Symons 1985; Polivka *et al.,* 1996, Flores *et al.,* 1997).

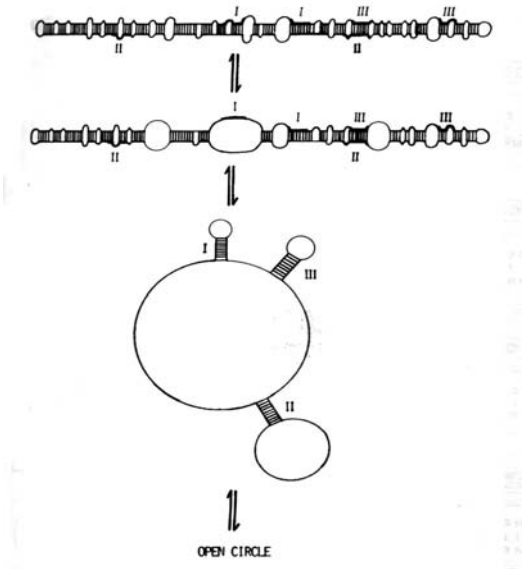


Figura3. Mecanismo de desnaturalización y renaturalización del PSTVd. Las estructuras esquemáticas están representadas a temperaturas de aproximadamente 25, 70, 75 y superiores a 95ºC. La formación de dos o tres horquillas estables (I, II y III) es posible en el PSTVd durante la transición principal. Las horquillas esperadas se forman por apareamiento de bases de las siguientes regiones: (I) 79-87/110-102, (II) 227-236/328-319 y (III) 127-135/168-160. (Hull 2002).

Horquilla II: Está constituida por secuencias localizadas en la rama inferior de la estructura de varilla a ambos lados de la CCR y se conserva en todos los viroides del género *Pospiviroides.* Por su homología estructural con algunas secuencias promotoras de genes eucariontes, se propuso que

podría actuar como señal de reconocimiento para factores de transcripción del hospedante. Además, se ha comprobado que mutaciones en esta horquilla conducen a la pérdida de infectividad y a altas frecuencias de reversión de los mutantes (Schroder y Riesner, 2002), lo que sugiere que el mantenimiento de esta región es crítico para la infectividad (Candresse *et al.,* 2001).

Horquilla III: Sólo se ha encontrado en el PSTVd, por lo que tiene un interés marginal (Palacio-Biela, 1999).

Se han descrito también elementos de estructura terciaria (Gast *et al.,* 1996; Hull, 2002). Este elemento es especialmente interesante ya que también se encuentra en el bucle E del ARN ribosomal 5S. Este bucle contiene apareamientos de bases no canónicos y forma parte del sitio de unión de, al menos, dos proteínas: el factor de transcripción TF-IIIA y una proteína ribosomal (L5) que está probablemente implicada en el transporte nucleolar del mencionado ARN ribosomal. Por ello, se ha sugerido que pudiera actuar como un sitio de unión entre el viroide y alguna proteína o factor de transcripción involucrados en su replicación y/o transporte intranuclear. Las secuencias que integran el bucle E forman parte de la CCR de los géneros *Pospiviroides* y *Cocadviroides*, por lo que es probable que dicho bucle puedan formarlo todos los miembros de estos géneros. En algunos viroides la adopción de conformaciones con regiones de estructura terciaria, puede resultar crítica para la actividad catalítica de las estructuras de *cabeza de martillo* (Butcher y Burke, 1994).

2.2.3. Características de las poblaciones

Uno de los factores que define las características de las poblaciones de los viroides es el mecanismo de replicación que estos siguen. Como ocurre con los virus cuyo genoma es ARN, los viroides se replican mediante una ARN polimerasa (Diener *et al*., 1993; Navarro *et al.,* 1999; Hull, 2002) que carece de actividad correctora. Como consecuencia de esto, y de los intensos procesos de recombinación intermolecular entre ellos durante la coinfección en los hospedantes, los viroides se presentan como poblaciones heterogéneas. El mecanismo de replicación genera nuevas variantes, coexistiendo una serie de secuencias con un alto porcentaje de homología entre sí, pero con variaciones puntuales en la secuencia nucleotídica, que pueden influir en la expresión de los síntomas en determinados hospedantes (Sarrazin *et al.,* 2001).

Esta dinámica es descrita por el modelo de *cuasiespecie* (Amexis *et al.,* 2001; Pincel *et al.,* 2002) propuesto inicialmente para virus y más tarde adaptado a los viroides. El término de *cuasiespecie* es empleado para denominar aquellas variantes de una misma especie que han sufrido cambios en su información genética, pero que siguen perteneciendo a la misma especie, ya que continúan conservando más de un 90 % de homología entre sus secuencias. No obstante la alta variabilidad existente en las poblaciones de viroides, de manera general se manifiesta una secuencia mayoritaria la cual es denominada secuencia maestra (Ruiz *et al.,* 2002; Sarrazin *et al.,* 2001; Domingo *et al.,* 2002; Kamp y Bornholdt, 2002).

La variedad de genomas generada en la replicación actúa como un conjunto y la distribución de la población se concentrará en secuencias de mayor eficacia biológica en un medio determinado (Ruiz *et al.,* 2002), el cual puede estar influenciado por las presiones que reciben por parte de sus hospedantes (Kofalvi *et al.,* 1997). Cualquier presión de selección actuará por medio de la célula hospedante, teniendo un mayor impacto aquellas provenientes del genotipo específico de la célula, así como las ocasionadas por los efectos de factores ambientales en la planta (Semancik y Duran-Vila, 1999; Matousek *et al*., 2001).

2.2.4. Aspectos biológicos

2.2.4.1. Síntomas macroscópicos de las enfermedades ocasionadas por viroides y efectos citopáticos

Los viroides poseen un amplio rango de hospedantes, tanto en plantas monocotiledóneas como dicotiledóneas, y los síntomas asociados a las enfermedades producidas por ellos son similares a aquellos causados por virus (Hull, 2002). Entre los síntomas macroscópicos más generales se describen enanismo, moteado, distorsión y necrosis de las hojas, desviación del crecimiento de la planta y arrugamiento de las hojas con aparición de zonas cloróticas (Hammond y Zhao, 2000). En algunos casos, pueden infectar a la planta sin provocar síntomas obvios de una enfermedad, mientras que bajo determinadas condiciones pueden llegar a causar la muerte de toda la planta (Palacio-Bielsa 1999; Hull 2002). Un aspecto común de las enfermedades producidas por viroides es que muestran la mayor severidad de los síntomas a temperaturas elevadas o cuando existen cambios bruscos de esta (Palacio-Bielsa 1999; Skoric *et al.,* 2001).

Por otra parte, entre los daños histológicos y citológicos se describe corrugación pronunciada y delgadez irregular en las paredes celulares de los tejidos infectados, daños en las estructuras membranosas de los plamodesmos (Hull, 2002), así como anormalidades degenerativas en los cloroplastos de las células infectadas (da Graca y Martin 1981).

Las infecciones por viroides no parecen causar grandes cambios en el metabolismo de los ácidos nucleicos de la planta hospedantes. Sin embargo, se describen importantes cambios en la concentración de varias proteínas de los tejidos infectados del hospedante, aunque no se tienen evidencias concretas de que este incremento sea específico de la infección por viroides; más bien estas proteínas parecen unirse a las moléculas de viroides en condiciones *in vivo* (Flores *et al.,* 2004).

2.2.4.2. Movimiento en la planta

En contraste con lo que ocurre en los virus que tienen proteínas de la cápsida defectuosas, y que por tanto su ARN se mueve muy lentamente a través de las células, los viroides se mueven rápidamente de célula a célula en la planta hospedante, comportándose como virus competentes. Este movimiento ocurre por la vía de los plasmodesmos y está mediado por una secuencia específica o motivo estructural de la molécula (Ding *et al.,* 1999; Hull, 2002).

El movimiento a largas distancias ocurre a través del floema (Hull, 2002; Zhu *et al.,* 2002) y la resistencia relativa del ARN del viroide a la acción de las nucleasas, probablemente facilita movimientos de este tipo. Existen algunos estudios que señalan que este movimiento está mediado por la interacción de determinadas regiones del viroide con alguna proteína del hospedante (Owens *et al*., 2001; Hull, 2002). Según plantean Maniataki *et al.* (2003), se ha identificado una interacción específica entre la proteína VirP1 de tomate y el dominio terminal derecho del PSTVd, en el cual está involucrado un lazo de 71 nucleótidos. Para este viroide se ha descrito además, que el movimiento dentro de los tubos sieves del floema ocurre atravesando regiones selectivas, en interacción con secuencias específicas del viroide (Zhu *et al.,* 2002)

La localización subcelular de los viroides puede variar de una especie a otra. Muchos de los experimentos realizados evidencian que la mayoría de ellos se encuentran localizados en el núcleo y algunos en el nucleolo (Hull, 2002). La excepción principal es con el ASBVd, el cual se ha encontrado en los cloroplastos del mesófilo (Navarro *et al.,* 1999; Bussiere *et al.,* 1999). Algunos estudios apuntan hacia la existencia de señales indicativas, en el caso del PSTVd, que consiste en alguna secuencia y/o motivo estructural para el importe nuclear y que este es mediado por un receptor saturable específico (Woo *et al.,* 1999; Zhao *et al.,* 2001).

2.2.4.3. Transmisión y Epidemiología

Los viroides son transmitidos de forma mecánica en la mayoría de sus hospedantes. Son capaces de mantenerse por largos períodos de tiempo en los instrumentos de corte y poda, lo cual constituye posiblemente, la fuente fundamental de diseminación en el campo (Wah y Symons, 1999; Timmermann *et al.,* 2001). La facilidad de transmisión en presencia de nucleasas, se debe de manera muy probable, a la estructura secundaria de la molécula y su asociación con determinados componentes del hospedante durante los procesos de transmisión (Hull 2002). También pueden ser transmitidos por injerto, propagación de material infectado y de forma vegetativa (Hull 2002).

Para algunos viroides, como el PSTVd, se ha detectado transmisión a través del polen y la semilla botánica en plantas de papa y pueden sobrevivir en las semillas infectadas por largos períodos de tiempo. Para este viroide, existe además, alguna evidencia de transmisión por el áfido *Macrosiphum euphiorbiae*, presentando una forma de transmisión en baja frecuencia y de manera no persistente (De Bokx y Piron 1981). Así mismo se informa que este viroide puede ser encapsidado dentro de las

partículas del virus del enrollado de la hoja de la papa (PLRV) y de esta manera puede ser transmitido de manera persistente por el áfido *Myzuz persicae* (Sulz.) (Querci *et al.,* 1997).

Los métodos principales por los cuales los viroides son transmitidos a través de los cultivos son mediante la propagación vegetativa, la contaminación mecánica y a través del polen y la semilla. La importancia relativa de estos métodos varía con los diferentes viroides y sus hospedantes (Hull, 2002).

Para la mayoría de las enfermedades producidas por viroides, los reservorios del inóculo parecen estar dentro del propio cultivo, lo cual cuestiona el sitio de origen de estas. Esta evidencia sugiere que muchas enfermedades causadas por viroides tiene un origen reciente. Se plantea que de ninguna de las enfermedades reconocidas causadas por viroides, se describe su existencia antes del año 1900. La aparición y rápida expansión de estas enfermedades, probablemente se debe a la fácil transmisión por métodos mecánicos y a que muchas cosechas modernas se cultivan a gran escala como monocultivos. Por tanto, a través del tiempo un viroide se presenta en un hospedante natural sin causar enfermedad, mientras escapa hacia un cultivo vecino susceptible y se expande rápidamente dentro de este (Hull, 2002).

2.2.4.4. Interferencia entre viroides

Existen numerosas evidencias que demuestran que la infección en una planta con una cepa suave de algunos viroides, es capaz de protegerla de una posterior infección con una cepa severa (protección cruzada) (Hull, 2002). En experimentos realizados donde se inoculan simultáneamente ambos tipos de cepas se ha observado una dominancia de la severa y la planta manifiesta síntomas acusados aún cuando el inóculo de la cepa suave fuese cien veces superior al de la cepa severa (Branch *et al*., 1988). En ensayos de protección cruzada realizada con cepas del CEVd, se ha descrito que el nivel de protección depende de la longitud del intervalo de tiempo que media entre la inoculación de la cepa suave y la cepa severa (Duran-Vila y Semancik, 1990).

Este fenómeno de protección cruzada ocurre comúnmente en los virus y viroides, no sólo entre cepas de un mismo viroide, sino además, entre especies diferentes (Pallás y Flores 1989; Hull, 2002). En estudios realizados se describe que el PSTVd es capaz de reducir el nivel de replicación del HSVd en plantas previamente infectadas, mientras que si son inoculadas a la vez con ambos viroides sólo es posible recuperar el ARN del PSTVd y se desarrollan lo síntomas característicos este viroide (Hull, 2002).

Aunque la protección cruzada se podría deber a una represión de los síntomas más que a una replicación enlentecida del viroide superinfectante, todavía no ha sido aclarada la importancia de las diferencias cuantitativas existentes en la replicación del viroide entre las plantas protegidas y las no protegidas (Diener, 1987).

Entre los viroides pueden establecerse relaciones cuando se encuentran coinfectando a una misma planta, las cuales pueden conducir a una modificación de la expresión de los síntomas o afectar solamente los niveles de acumulación de alguna de las especies coinfectantes. Determinadas observaciones sugieren un papel de mutualismo para los viroides presentes en un hospedante específico (Semancik y Duran-Vila, 1999). En el caso de las variantes del HSVd presentes en cítricos, se ha descrito un efecto positivo cuando están presentes variantes patogénicas y no patogénicas. En este caso se combinan los efectos de enanismo y aumento del tamaño del fruto de manera que resulta provechoso para los agricultores (Semancik *et al.,* 1997).

Evidencia de recombinación entre viroides

Los datos de secuencias nucleotídicas de viroides muestran que es altamente probable que existan eventos de recombinación entre ellos, fundamentalmente durante la recombinación en infecciones mixtas. Las evidencias sugieren que el TASVd pudiera ser un recombinante que contiene la mayor parte de la secuencia del CEVd, pero el sitio del dominio T_R está reemplazado por el del PSTVd. En el caso del AGVd, este contiene en su secuencia segmentos de los viroides CEVd, PSTVd, ASSVd y GYSVd (Spence y Barbara, 2000).

Las comparaciones de secuencias sugieren que el CLVd puede haberse originado a partir de eventos de recombinación entre el PSTVd y el HSVd (Owens *et al.,* 2003). En este sentido los análisis revelaron una inesperada complementariedad entre la porción superior del dominio patogénico y del terminal derecho que facilita el breakdown de la estructura nativa en forma de varilla, y la formación de la estructura secundaria de la horquilla II. Se ha descrito recombinación además, entre viroides de cítricos que pueden dar lugar a nuevas variantes de CVd-III (Owens *et al.,* 2000). En plantas de berenjena se sugiere la recombinación interna de CEVd por la duplicación de 96 nucleótidos del dominio terminal derecho (Fadda *et al*., 2003).

2.2.4.5. Modelos de replicación

La información genética contenida en los viroides no es suficiente para codificar una ARN polimerasa, son pocos los viroides que contienen uno o más codones AUG (codón de iniaciación) y, además, no se ha demostrado que su ARN funcione como ARN mensajero. Por tanto, el criterio aceptado es que los viroides no se traducen para dar polipéptido alguno (Diener 1999; Symons y Randles, 1999; Warrilow y Symons, 1999). De manera general, se asume que ellos se replican por copia directa del ARN utilizando todos los componentes requeridos para la replicación provenientes del hospedante (Flores *et al.,* 2004).

Se han propuesto varios modelos para detallar la replicación de los viroides (figura 4). Uno de ellos describe que durante la replicación, la cadena positiva circular (definida para el ARN nativo del viroide) es replicada mediante círculo rodante, produciendo cadenas lineales negativas multiméricas, las cuales sirven para la replicación de cadenas multiméricas de ARN positivas. Esta última es

circularizada en el paso final, formando unidades de viroides positivos individuales. Esta es la llamada Vía Asimétrica, la cual involucra solamente estructuras de cadenas positivas circulares (Branch *et al.,* 1988; Hull, 2002).

Otro modelo plantea una variante del mecanismo de replicación por círculo rodante, en el cual la cadena lineal multimérica negativa es cortada en monómeros, los que una vez circularizados pueden actuar como un molde de círculo rodante para producir cadenas lineales multímeras positivas. Esta es la llamada Vía Simétrica, la cual involucra estructuras de cadenas circulares positivas y negativas (Hull, 2002).

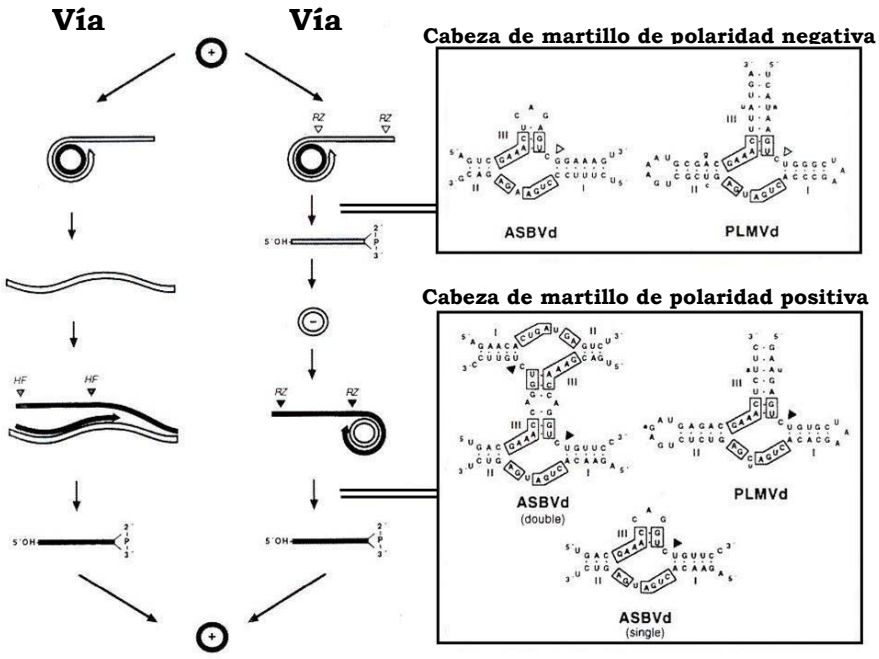


Figura 4: Modelos para la replicación de viroides. La polaridad positiva (líneas rellenas) es asignada por convención al ARN más abundante e infeccioso, y la polaridad negativa (líneas abiertas) a las cadenas complementarias a estas. La vía asimétrica alternativa y la simétrica involucran uno o dos círculos rodantes respectivamente. En la variante simétrica el corte de las cadenas multiméricas positivas y negativas está mediado por ribozimas *cabeza de martillo* (RZ), los cuales conducen a ARNs lineales monoméricos con 5´hidroxil y 2´,3´ fosfato cíclico terminal. Las cabezas de flecha denotan los sitios de corte. Las estructuras *cabeza de martillo* que pueden formarse por los ARNs de ASBVd y PLMVd se muestran a la derecha; los nucleótidos conservados están enmarcados y las sustituciones encontradas en dos clones de cADN del PLMVd se indican por las letras inferiores. En la variante asimétrica, el corte de las cadenas multiméricas positivas está mediada por un factor hospedante (HF) los cuales generan monómeros lineales de ARNs conteniendo probablemente 5´ hidroxil y 2´,3´ fosfato cíclico terminal (Flores *et al.,* 2005).

El primero de los modelos planteados anteriormente, es el más aceptado, debido a que no se han encontrado monómeros circulares negativos en los miembros de la familia *Pospiviroidae* (Branch *et al.,* 1988). Sin embargo, se han encontrado estructuras de cadenas de ARN monoméricas circulares negativas en las infecciones con ASBVd (Flores *et al*, 2004), lo cual sugiere que la replicación de este viroide sigue la vía simétrica.

Enzimas involucradas en la replicación

Estudios con aislados nucleares sugieren que la transcripción de cadenas negativas a cadenas positivas de los viroides de la familia *Pospiviroidae,* es llevada a cabo por la enzima del hospedante ARN polimerasa II dependiente de ADN encontrada en el nucleoplasma (Warrilow y Symons, 1999;

Filipovska y Konarska, 2000). En PSTVd se ha descrito la existencia de al menos dos sitios diferentes para el comienzo de la replicación (Fels *et al.,* 2001).

En el caso de la familia *Avsunviroidae* se describe que la replicación del ASBVd ocurre en los cloroplastos, en los cuales se han identificado fundamentalmente dos ARN polimerasas. Los resultados de estudios realizados señalan que la ARN polimerasa NEP es la que tiene una participación más activa en la replicación de este viroide, aunque no se descarta la posible implicación de la ARN polimerasa TR (Navarro *et al*., 2000).

Mecanismos de corte

Los estudios demuestran que existen al menos dos mecanismos de corte. Los viroides miembros de la familia *Avsunviroidae* realizan un proceso de auto-corte, en común con la mayoría de los ARN satélites, mientras que el resto requiere un factor del hospedante, posiblemente una endonucleasa específica, presente en el núcleo de la célula (Tabler y Tsagris, 2004). Para los ARNs satélites se ha propuesto una estructura secundaria llamada *cabeza de martillo* la cual se forma por apareamiento de bases entre una serie de secuencias nucleotídicas cortas altamente conservadas alrededor de los sitios específicos de corte. Esta estructura parece ser un prerrequisito para el auto-corte (Forster y Symons, 1987; Navarro y Flores, 2000; Navarro *et al.,* 2000). Para el ASBVd, esta estructura no parece lo suficientemente estable por lo que se propuso una doble estructura de *cabeza de martillo,* involucrando la asociación de dos cadenas positivas o dos *cabezas de martillo* negativas del ASBVd (Flores *et al.,* 2004) (figura 5).

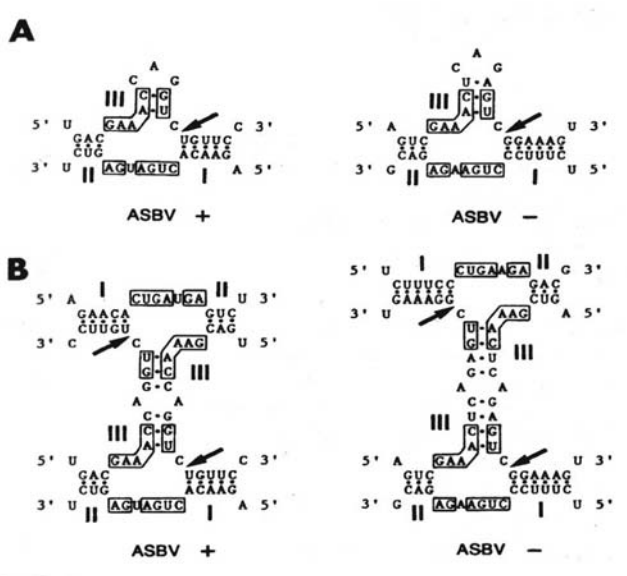


Figura 5: Estructuras de cabezas de martillo propuestas para el autocorte del ARN de ASBVd. A: Estructura de *cabeza de martillo* simple propuesta por Hutchins *et a.* (1986). B: Doble estructura de *cabeza de martillo* propuesta para el ARN del ASBVd por Forster *et al*. (1988). Los sitios de corte se indican por flechas.

Este modelo posee un sitio de corte estable y además quedó demostrado que sólo los dímeros o multímeros pudieron formar la estructura doble de *cabeza de martillo* y así ser auto-cortados. Las secuencias requeridas para formar las estructuras de auto-corte en las cadenas positivas y negativas del ASBVd están situadas a ambos lados en el medio de la molécula (De la Pena y Flores, 2001).

Para el resto de los viroides no se ha evidenciado actividad catalítica. Ellos requieren la presencia de proteínas con esta actividad para llevar a cabo el paso de ruptura de cadenas multiméricas a monómeros lineales. Se ha evidenciado que existen supuestos sitios de corte y ligazón en estos tipos de viroides, así como que secuencias del viroide repetidas una tras otra son infecciosas en alto grado, a diferencia de una secuencia monomérica (Diener, 1986). En el PSTVd se han encontrado evidencias de un lazo con uniones no canónicas en el CCR que contiene los requerimientos estructurales y funcionales para el correcto procesamiento durante el corte de las cadenas poliméricas (Schrader *et al.,* 2003).

2.2.4.6. Mecanismos de patogénesis

A pesar de sus peculiaridades, se considera que los viroides se comportan de manera similar a los virus en cuanto a los mecanismos patogénicos (Singh, 1998). Algunas hipótesis plantean que el viroide, en su conformación nativa, puede tener una fuerte afinidad con una o más proteínas del hospedante formando un enlace complejo en las células infectadas (Flores *et al.,* 2004). Otras hipótesis plantean que dada la similitud entre ARNs celulares y el viroidal, existen posibles interacciones entre ellos, las cuales pueden causar formaciones de complejos que afecten el metabolismo del hospedante diferenciadamente, según el tipo de cepa viroidal que afecte (Kofalvi *et al.,* 1997; Reanwarakorn y Semancik. 1998).

Las CCR han sido identificadas como un posible sitio de unión con elementos celulares involucrados en la replicación y/o transporte intranuclear de los viroides, por tener similitud estructural con el bucle del ARN ribosomal 5S (Ridgen y Rezaian, 1992; Rakowski y Symons, 1994).

Como se explicó anteriormente, a pesar de la aceptación del modelo de dominios funcionales dentro de la molécula del viroide, para la ejecución de cada actividad biológica interviene más de un dominio. Experimentos con quimeras demuestran la importancia de secuencias dentro del $T_{L,}$ más que en el dominio P, que son determinantes en la severidad de los síntomas (Sano *et al.,* 1992; Diener *et al.,* 1993).

Evidentemente, la inducción de los síntomas por viroides es un proceso complejo, en el que al menos tres de los cinco dominios están involucrados, donde la severidad de los síntomas es el resultado de interacciones entre determinantes localizados en esos dominios (Sano *et al.,* 1992; Diener *et al.,* 1993).

2.2.4.6.1. Efectos de los viroides sobre las proteínas de las células hospedantes

La infección con viroides no parece causar cambios apreciables en el metabolismo de los ácidos nucleicos del hospedante. Sin embargo, se han hallado marcadas variaciones en los contenidos de

varias proteínas del hospedante en tejidos infectados (Hammond y Zhao, 2000; Itaya *et al.,* 2002; Hull, 2002).

Se han detectado incrementos de proteínas relacionados con la patogénesis tras infecciones con viroides, algunas de las cuales parecen estar implicadas en la unión con moléculas de viroides *in vivo*. Este hecho pudiera estar relacionado con el desarrollo de los síntomas de la enfermedad, a causa de que pudiera influir en la función de dichas proteínas o un cambio en su carácter regulador. Hasta el momento se han identificado varias proteínas involucradas, como son las pertenecientes a ribosomas, las que forman parte del aparato fotosintético y algunas con función desconocida (Hull, 2002).

Hiddinga *et al*. (1988) identificaron una proteína de 68 KDa (denominada P68) codificada por el hospedante, que es fosforilada diferencialmente en extractos de tejidos infectados por viroides. La proteína parece ser una quinasa dependiente de ARN de doble cadena, inmunológicamente relacionada con una proteína similar que existe en células de mamíferos implicada en la regulación celular de síntesis de virus (Hull, 2002).

El ARN del viroide, sintetizado durante la infección, tiene el potencial de activar la P68 y cuenta con estrategias para disminuir su regulación y permitir la replicación y supervivencia del viroide. El PSTVd induce la autofosforilación de esta proteína, que será en mayor o menor medida (alta o baja concentración de enzima que se fosforila, respectivamente), según se le añadan cepas severas o suaves del viroide. De esta manera, se demuestran los efectos diferenciales de cepas de viroides induciendo diferentes niveles de patología sobre los sistemas metabólicos. Estos resultados sugieren que la activación de la enzima de una planta, homóloga a la P68 de mamífero, puede representar un evento de la patogénesis del viroide (Hiddinga *et al*., 1988).

2.2.4.6.2. Silenciamiento post-transcripcional de genes

El silenciamiento post-transcripcional de genes (PTGS) es un mecanismo para la regulación de la expresión génica en eucariontes que tiene como resultado la degradación de secuencias específicas de ARN de simple cadena (scARN) de origen interno o foráneo (Matzke *et al.,* 2000). Este fenómeno parece ser activado por ARN de doble cadena (dcARN), el cual es un intermediario de la replicación de los virus de ARN de simple cadena y además puede formarse en sistemas de expresión de copias múltiples de transgenes. Estos dcARN se procesan en fragmentos de 21-25 nucleótidos de longitud, llamados pequeños ARN de interferencia (siARN, del inglés small interfering), mediante una enzima similar a la ribonucleasa III (Dicer). Los siARN guían a una segunda ribonucleasa (RISC, del inglés *RNA induced complex*) para la degradación del scARN análogo. La presencia de siARN homólogos y complementarios al scARN se considera como un marcador para el PTGS (Flores *et al*., 2004).

En plantas el PTGS se informa para los scARN citoplasmáticos partir de genes nucleares endógenos, transgenes y ARN y ADN de virus (Flores *et al.,* 2004). Recientemente, se detectó siARN específico del PSTVd en plantas infectadas, lo cual sugiere que este viroide puede inducir el PTGS y que el proceso tiene lugar en el núcleo celular donde se localizan isoformas de Dicer (Denti *et al.,* 2004). Además se detectaron siARN derivados del PLMVd y CChMVd. Los niveles de acumulación de siARN inducida por cepas severas o suaves de PSTVd y CChMVd son esencialmente los mismos, por lo que la concentración *in vivo* de estos siARN no son capaces de explicar las diferencias en el desarrollo de los síntomas (Papaefthimiou *et al.,* 2001).

En estudios desarrollados con el virus del mosaico del nabo (TuMV) en *Arabidopsis,* se identificó la presencia de micro ARN (miARN), los cuales son ARN pequeños no codificantes, de talla similar a los siARN, que son producidos por Dicer y que actúan sobre precursores de ARN con una estructura secundaria típica, similar a un gancho de pelo. Estos miARN participan en la regulación de la expresión de genes endógenos. Si se asume que ciertos siARN específicos de viroides actúan como miARN endógenos, pudieran marcar ARN mensajeros del hospedante y promover su degradación. Esta posibilidad es consistente con el hecho de que cambios mínimos que afectan aproximadamente el 1% de la secuencia de miembros representativos de de las dos familias de viroides son suficientes para transformar una cepa severa en latente. Este mecanismo pudiera tener lugar en el fenómeno de protección cruzada (Flores *et al.,* 2004).

2.3. Viroides en cítricos

Los intentos iniciales dirigidos a caracterizar los viroides de los cítricos se basaron en estudios de movilidad electroforética, afinidad en cromatografía de celulosa CF-11, hibridación molecular, rango de hospedantes y sintomatología en cidro (*Citrus medica* L.) Etrog Arizona 8-S1, lo que permitió clasificarlos en cinco grupos diferentes. La secuenciación de diferentes fuentes de estos viroides ha confirmado que se trataba de variantes de cinco especies de viroides distintos (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999) (tabla 2). Más recientemente se ha descrito la presencia de una nueva especie informada solamente en Japón, identificada con las siglas CVd-OS (del inglés *viroid citrus*, en muestras llamadas OS) (Ito *et al.,* 2001).

De las especies de viroides identificadas en cítricos sólo dos son causantes de enfermedades bien caracterizadas hasta el momento: la exocortis de los cítricos (causada por el viroide de igual nombre, CEVd) y la cahexia de los cítricos (ocasionada por un tipo de variante del viroide del enanismo del lúpulo, HSVd) (Duran-Vila *et al.,* 1988). El resto de las especies descritas provocan síntomas muy leves, generalmente relacionados al enanismo y en la mayoría de los casos no provocan síntoma alguno (Duran-Vila *et al*., 1988; Ito *et al*., 2001; Pelchat *et al.,* 2003).

Tabla 2. Clasificación de los viroides de los cítricos y su relación con las enfermedades del cultivo.

Viroides de los cítricos			Efecto en árboles de campo
Subfamilia	**Género**	**Especie**	
Pospiviroinae	Pospiviroides	CEVd	Exocortis
Apscaviroinae	Apscaviroides	CVd-1 (CBLVd)	Enanizante
Apscaviroinae	Apscaviroides	CVd-OS	Necrosis débil de la hoja
Pospiviroinae	Hostuviroides	CVd-II (HSVd): CVd-IIa	Enanizante
		CVd-IIb	Cachexia
Apscaviroinae	Apscaviroides	CVd-III	Enanizante
Pospivironae	Cacadviroides	CVd-IV	Enanizante

2.3.1. La cachexia de los cítricos

2.3.1.1. Antecedentes

Hacia la primera mitad del siglo XX se describieron, por primera vez en Palestina, síntomas consistentes en la aparición de acanaladuras en la madera del limero dulce de Palestina (*C. limettioides* Tan.) empleado como patrón. A esta enfermedad se le asignó el nombre de **xiloporosi**s. Posteriormente, en California, se utilizó el término de **cachexia**, para designar una enfermedad del tangelo Orlando, cuyo síntoma más característico era la presencia de acanaladuras en la cara cambial de la madera y proyecciones en la corteza con fuertes impregnaciones de goma (Chils, 1950). En un principio se consideró que ambas enfermedades eran causadas por diferentes agentes patógenos, pero actualmente se ha demostrado que estas reflejan las variadas respuestas que se producen en diferentes hospedantes atribuidas al mismo viroide. Dado que la primera transmisión experimental del agente causal fue llevada a cabo por Childs, se ha recomendado designar a la enfermedad como cachexia, aunque en los países de la cuenca mediterránea se la suele seguir denominando xiloporosis (Semancik, 1999).

Entre las variedades de cítricos sensibles a la cachexia se encuentran los clementinos, satsumas, mandarinos y mandarinos híbridos sobre cualquier patrón, así como el limero Rangpur y alemow empleados como patrones (Reanwarakorn y Semancik, 1998; Palacio.Bielsa y Duran-Vila, 2000).

La caracterización de una serie de aislados de campo que inducían la enfermedad de cachexia, permitió aislar y purificar al agente, al que inicialmente se denominó viroide de la cachexia de los cítricos (CCaV) (Semancik *et al.,* 1988). Su tamaño se estimó en unos 300 nucleótidos y se incluyó en el grupo II de los viroides de cítricos (CVd-II) identificándose como CVd-IIb. Sin embargo, la

caracterización biológica de diversas fuentes de CVd-II mostró que existían aislados que inducían la enfermedad de la cachexia (aislados patogénicos) y aislados que a pesar de que también se multiplicaban en el hospedante, no ocasionaban nunca, síntomas visibles de la enfermedad, es decir, estos aislados se comportaban como infecciones latentes en las especies sensibles a dicha enfermedad (aislados no patogénicos) (Palacio-Bielsa 1999).

2.3.1.2. Descripción molecular y aspectos de caracterización

La secuenciación de aislados patogénicos y no patogénicos demostró que ambos eran variantes del viroide de enanismo del lúpulo HSVd. Sin embargo, desde el punto de vista de la patología de cítricos hay que considerar la existencia de dos tipos de variantes: el tipo CVd-IIa que incluye variantes no patogénicas y el tipo CVd-IIb que incluye aquellas que inducen la enfermedad de la cachexia (Reanwarakorn y Semancik, 1999a).

El HSVd es uno de los viroides de mayor rango de hospedantes, entre los que se encuentran el lúpulo, pepino, viña, cítricos, ciruela, melocotón, pera (Amari *et al.,* 2001), albaricoque y almendra (Astruc *et al*., 1996). La enfermedad que le da nombre a este viroide, enanismo del lúpulo, es endémica solamente en Tohuku, un distrito japonés. Estudios realizados en esta zona revelan que existe una marcada variabilidad entre las secuencias del HSVd y que, muy probablemente, el origen de las variantes presentes en el lúpulo provine de la vid (Sano *et al.,* 2001).

Estudios realizados por Reanwarakorn y Semancik (1998) identificaron una serie de cambios nucleotídicos específicos entre un aislado de CVd-IIa y otro de CVd-IIb, que están relacionados con su patogénesis. Los aislados no patogénicos difieren del HSVd en solamente dos nucleótidos cambiados en las posiciones 153 (U-A) y 270 (A-G). Esto refleja que, tanto la variante CVd-IIa como CVd-IIb, poseen una secuencia homóloga conservada del 92.5 al 99.3 %, característica de la familia del HSVd. La mayor distinción entre CVd-IIa y las variantes inductoras de cachexia se debe al agrupamiento común de cinco nucleótidos en el dominio variable (V) (esencial para la inducción de la enfermedad), los cuales se han propuesto como reguladores de la inducción de la cachexia entre las variantes del HSVd (Reanwarakorn y Semancik, 1998; Semancik, 1999; Palacio-Bielsa *et. al,* 2004) (figura 6 y tabla 3). Este es uno de los ejemplos más evidentes de la importancia que desempeña la secuencia nucleotídica, y la estructura que de ella se deriva, para la realización de las funciones biológicas de los viroides.

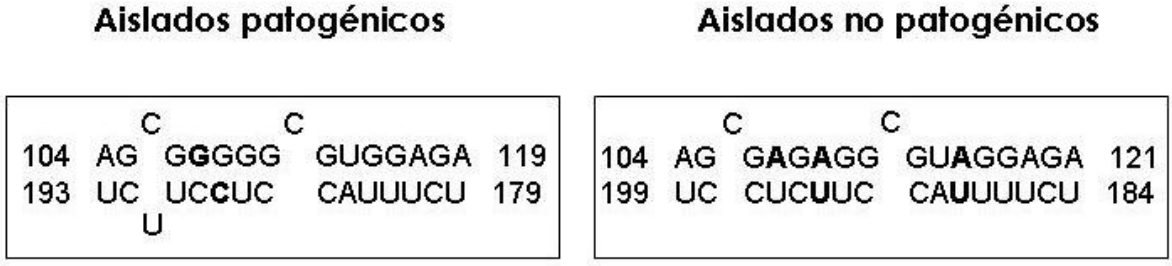


Figura 6. Estructura secundaria de varilla correspondiente a la zona del dominio V del HSVd en cítricos. En negritas se señalan los cinco nucleótidos que diferencian a las secuencias de los aislados patogénicos y no patogénicos.

Tabla 3. Diferencias en las secuencias motivos de variantes del HSVd cítricas relacionada con la patogenicidad (Palacio-Bielsa, 1999).

Secuencia motivo	Posición de los cambios en el dominio **Variable**				
	Cadena superior			**Cadena inferior**	
	1- nt **108**	2- nt **110**	3- nt **116**	4- nt **189**	5- nt **194**
Patogénica (CVd-IIb)	G	-	-	-	C
No patogénica (CVd-IIb)	A	A	A	U	U

Estudios realizados sobre la predicción de la estructura secundaria de las variantes cítricas del HSVd han mostrado que la estructura de varilla de las variantes patogénicas es menos estable, aunque existe similitud entre la estructura de varilla de ambos tipos de aislados. No obstante, se plantea que el dominio V de las variantes patogénicas parece estar más relajado. Esta diferencia estructural, muy tenue, pudiera ser directamente responsable de las diferencias existentes entre ambos tipos de aislados en cuanto a la patogenicidad (Palacio-Bielsa y Duran Vila, 2000).

Para el HSVd se ha propuesto una división en cinco grupos, tres de los cuales son los mayores y se denominan tipo ciruela, tipo lúpulo y tipo cítricos, y dos grupos menores que se presume que sean derivados de eventos recombinativos entre miembros de los principales grupos (Kofalvi *et al.,* 1997; Amari *et al.,* 2001). El tipo ciruela incluye aislados de melocotón, ciruela y viña; el tipo lúpulo incluye aislados de lúpulo, viña y melocotón y, por último, el de tipo cítricos, contiene de cítricos y pepino (Amari *et al.,* 2001). Un gran número de eventos recombinativos entre variantes del HSVd fueron detectados; algunos de los cuales parecieron originar grupos enteros del HSVd. Sorpresivamente se reveló que el grupo tipo lúpulo es probablemente el resultado de una recombinación entre miembros del tipo ciruela y del tipo cítricos (Kofalvi *et al.,* 1997). Los eventos recombinativos en HSVd son mucho más frecuentes que los esperados hasta el momento y las recombinaciones intraespecíficas podrían ser un mecanismo general en la evolución de los viroides (Candresse *et al.,* 1997; Amari *et al.,* 2001).

Caracterización molecular mediante el polimorfismo conformacional de ADN monocatenario (SSCP)

La migración electroforética en geles de los ácidos nucleicos de simple y de doble cadena difiere bastante, por lo que puede ser usada en las técnicas de caracterización. El análisis del polimorfismo de conformación de ADN monocatenario (SSCP, siglas en inglés single) estuvo originalmente basada en los tipos de migración de las moléculas de ADN monocatenario (ssADN) dadas sus estructuras primarias y terciarias (Hull, 2002). Este análisis permite diferenciar fragmentos de ADN del mismo tamaño que contienen diferencias en la secuencia de nucleótidos (Foissac y Duran-Vila, 2000). La técnica se basa en que el ADN parcialmente desnaturalizado (dsADN) migra como dos bandas de

ssADN cuando se somete a electroforesis en geles de poliacrilamida no desnaturalizantes (PAGE). La migración de las dos hebras depende de su conformación y, por tanto, de la secuencia de nucleótidos. Se ha demostrado que pequeños cambios de secuencia pueden alterar la conformación del ssADN y, en consecuencia, su perfil electroforético (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999).

El análisis del SSCP se ha utilizado para identificar mutaciones en fragmentos de ADN (Hongyo *et al.,* 1993) y para evaluar la heterogeneidad de secuencias de aislados de virus (Yap *et al.,* 1992; Enomoto *et al.,* 1994; Rubio *et al.,* 1996). El análisis a partir de secuencias de ADN poco comunes, como son las derivadas de los ARNs viroidales, puede resultar una técnica útil para su caracterización (Foissac y Duran-Vila, 2000). Además, esta técnica proporciona información valiosa para la identificación de las secuencias más representativas de un determinado aislado de campo, en la identificación de variantes minoritarias en la población, en la señalización de regiones del genoma que muestran variabilidad y en estudios poblacionales. Aunque puede señalarse que una de sus desventajas es la falta de correlación entre el número de cambios y la variación de los perfiles del SSCP, para lo que se necesita incrementar la resolución electroforética (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999).

2.3.2. Métodos de detección

Debido a que los viroides no producen proteínas específicas imponen cierta restricción en los métodos que puedan emplearse para su detección. De esta manera, los métodos inmunológicos, tan ampliamente utilizados para la detección de virus de animales y plantas, no pueden ser usados en el diagnóstico de los viroides (Hull, 2002). Igualmente, las técnicas de microscopía electrónica son inapropiadas, ya que no se pueden detectar partículas características de ellos. Por estas razones, los procedimientos para su detección han sido confinados a pruebas biológicas, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis*), reacción en cadena de la polimerasa combinada con la reverso transcripción (RT-PCR, del inglés *reverse transcription* y *polimerase chain reaction*) y la hibridación de ácidos nucleicos (NASH, del inglés *nucleic acids hibridization*) (Palacio-Bielsa 1999; Hull, 2000).

Los **ensayos biológicos**, basados en la inoculación de savia o por injerto a plantas indicadoras en las que manifiestan síntomas característicos, han sido imprescindibles para la identificación y caracterización de los viroides (Duran-Vila *et al,* 1988). En particular, en el caso de los viroides de cítricos, el ensayo biológico alcanza un papel determinante debido a que hasta el presente, los métodos de diagnóstico basados en el análisis de los ácidos nucleicos, no son lo suficientemente sensibles para detectar a estos patógenos a partir de plantas de campo. Por lo tanto, es necesario utilizar a las plantas indicadoras como amplificadores biológicos previo al análisis de los ácidos nucleicos (Palacio-Bielsa, 1999).

Para el caso específico de la cachexia, se ha venido utilizando como indicador el mandarino Parson´s Special injertado sobre limonero rugoso. Los síntomas de cachexia se manifiestan como depósitos de goma en la línea de unión del injerto, y para su expresión es preciso mantener las plantas a 28-32ºC

durante un período de 12 a 18 meses (Palacio-Bielsa 1999; Velázquez, 2004). Existe además una planta indicadora denominada clemelin 11-20 (resultado del cruzamiento de clementina (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. y naranjo Hamlin (*Citrus sinensis* L. Osb.) en la cual la síntomas específicos de cahexia ocurren con mayor rapidez e intensidad que en el mandarino Parson´s Special (Pérez, 2004a). Además de las especies cítricas, plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) son capaces de replicar al HSVd a niveles detectables por técnicas de análisis de los ácidos nucleicos, sin embargo, aunque se ha descrito que estas plantas pueden desarrollar algunos síntomas ligeramnet más severos ante la presencia de variantes del HSVd causantes de cachexia que ante las variantes no patogénicas, resulta difícil poder discernir entre ellas (Duran-Vila *et al.,* 1988).

Aunque los ensayos biológicos han demostrado ser el método más sensible para el diagnóstico de la cachexia y se han venido utilizando en todo el mundo, estos métodos presentan serios inconvenientes, ya que requieren gran tiempo de incubación para la expresión de los síntomas, los resultados pueden ser erráticos y las interferencias con otros viroides de cítricos dificultan o impiden la expresión de síntomas (Pina *et al.,* 1991).

La **electroforesis en gel de poliacrilamida** se basa en la propiedad que tiene el ARN de los viroides de migrar, en los geles, de forma diferente al resto de los ARNs. Se han desarrollado estudios termodinámicos de los viroides, los cuales han demostrado que la transición de su estado nativo a un estado desnaturalizado puede lograrse simplemente con un incremento en la temperatura o un cambio en la fuerza iónica, al que se le denomina R-PAGE (*return*-PAGE) (Singh y Singh, 1995). Por este método se pueden detectar todas las especies de cítricos descritas hasta el momento, sin necesidad de conocer previamente alguna característica propia del viroide en cuestión. Sin embargo, su aplicación en el diagnóstico rutinario, en un número amplio de muestras, tiene la desventaja de ser muy laborioso y, además, el discernimiento entre las diferentes especies sólo puede realizarse a través de la comparación de las tallas de estas.

La **hibridación de ácidos nucleicos (**NASH, siglas en inglés), se basa en la interacción de pares de bases por puentes de hidrógeno que puede ocurrir entre moléculas de simple cadena, polaridad opuesta y de suficiente similitud en su secuencia nucleotídica (Dijkstra y de Jager, 1998; Hull, 2000). Entre los formatos más empleados se encuentran el *dot-blot* (Hull, 2002), *sandwich* (Ranki *et al.,* 1983), impresión de tejido (Knapps *et al.,* 1995; Romero-Durban *et al.,* 1995), *in situ* (Harper *et al.,* 1999; Muro-Cacho, 1999), entre otros.

Las sondas pueden ser de ADN de simple cadena, ADN de doble cadena, ARN de simple cadena sintetizado *in vitro* y ARN de doble cadena (Hadidi *et al.,* 1995). Pueden estar marcadas con una molécula radiactiva (usualmente ^{32}P), un ligando no isotópico (biotina, digoxigenina) o unirse directamente a una enzima (fosfatasa alcalina, peroxidasa) (Accotto *et al.,* 1998). La detección de los

híbridos formados puede realizarse por autorradiografía, detección enzimática, colorimétrica o quimioluminiscente, en dependencia del marcador empleado.

La hibridación de ácidos nucleicos es un método altamente sensible y su aplicación en el diagnóstico rutinario de los viroides de cítricos es altamente recomendado (Palacio-Bielsa, 1999; Velázquez, 2004), ya que permite el análisis simultáneo de un amplio número de muestras.

La **reacción en cadena de la polimerasa** (PCR, siglas en inglés) consiste en la hibridación de cebadores sintéticos complementarios a una secuencia blanco y la síntesis de múltiples copias de cADN de la secuencia comprendida entre estos mediante una ADN polimerasa termoestable (Shamloul *et al.,* 2002; Ito *et al.,* 2002). Inicialmente estuvo dirigida sólo para ADN, sin embargo, puede aplicarse al ARN con la obtención previa del ADN complementario mediante una transcripción reversa de la región deseada. Este procedimiento es denominado RT-PCR y ha permitido la detección de viroides y virus de plantas (Tessitori *et al.,* 1996; Nie y Singh, 2000). Por este método se ha informado la detección simultánea de seis viroides en cítricos y ASGVd (Ito *et al.,* 2002); la detección del ASBVd empleando además marcadores fluorescentes (Schnell *et al.,* 2001) y, el diagnóstico simultáneo del PSTVd y virus que afectan a la papa (Nie y Singh, 2001).

La PCR se ha acoplado, además, con la captura de partículas virales mediante el empleo de anticuerpos inmovilizados, denominado inmunocaptura en PCR (IC-PCR o IC-RT PCR). En el caso de los viroides se utilizan anticuerpos monoclonales específicos para cadenas dobles de ARN y se emplea el método de doble anticuerpo directo en ELISA (Shamould *et al.,* 2002).

La adopción de la PCR para la detección rutinaria de fitopatógenos ha sido lenta. Las razones fundamentales han sido, la presencia de inhibidores de la reacción en los extractos obtenidos a partir de plantas (Koonjul *et al.,* 1999), la necesidad de geles para el análisis de los resultados (particularmente cuando se analiza un gran número de muestras) y los problemas de contaminación durante la manipulación, los cuales constituyen un riesgo de obtener resultados falsos positivos (Mumford *et al.,* 2000).

En los últimos años los avances en la bioinformática han asistido a la PCR mediante el desarrollo de modalidades electrónicas denominadas PCR electrónica o PCR *in silico.* Este término se refiere inicialmente, a un procedimiento computacional que se usa para buscar secuencias en el ADN que constituyen marcas de determinado sitio (STS, del inglés *sequence tagged sites*), los cuales están definidos por una pareja de cebadores y la talla de un producto esperado. El origen de este procedimiento tuvo lugar fundamentalmente a partir de la construcción del mapa del genoma humano (Schuler, 1997), y desde entonces se han desarrollado programas que contienen las herramientas para una eficiente implementación de esta metodología de búsqueda y, permite en cierta medida llevar a cabo una masificación de la de los análisis modernos de genomas

(Rotmistrovsky *et al.,* 2004). La PCR electrónica es una herramienta útil, que se ha empleado fundamentalmente en la biomedicina (Schuler, 1997; Regeard *et al.,* 2004), sin embrago su uso en la fitopatología aún es muy limitado.

En la actualidad uno de los métodos más empleados para la detección de viroides de cítricos es la **combinación de ensayos biológicos y moleculares**. Se ha propuesto un método que combina las excelentes propiedades del cidro Etrog Arizona 861 S-1 para obtener niveles detectables de viroides y el análisis de ácidos nucleicos por sPAGE y tinción de plata (Duran-Vila *et al.,* 1993). Este método permite detectar todos los viroides de los cítricos, como bandas discretas con distinta movilidad electroforética. Con ello resulta innecesaria la inoculación en el mandarino Parson´s Special y, además, no se manifiestan las interferencias entre las variantes de CVd-II que afectan a la expresión de síntomas en el diagnóstico biológico con este indicador (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999). No obstante, es deseable el diseño de métodos de detección de viroides obviando la necesidad de utilizar el cidro como huésped intermediario y/o simplificando las operaciones asociadas al análisis de ácidos nucleicos por sPAGE, que limitan el número de muestras a analizar en un período determinado (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999). Este método de amplificación biológica también puede ser combinado con la NASH brindando exitosos resultados (Palacio-Bielsa, 1999).

2.3.3. Control de las enfermedades ocasionadas por viroides

El manejo de las enfermedades producidas por viroides ha recibido poca atención, si se compara con los adelantos obtenidos en las técnicas de detección de estos patógenos. Las oportunidades para controlar las enfermedades producidas por estos serán mayores, con un mejor conocimiento de la bioquímica, bases moleculares e interacción con el hospedante de estos patógenos (Singh y Dhar, 1998).

El método más eficaz para el control de las enfermedades producidas por viroides en cítricos, es la utilización de plantas libres de estos patógenos en las nuevas plantaciones y evitar su dispersión de plantas infectadas a plantas sanas. Es importante tener en cuenta las prácticas culturales que incluyan la desinfección de las herramientas de corte y poda con el uso de una solución de hipoclorito de sodio al 1-2%, o hipoclorito de calcio al 10%, lo cual puede evitar la dispersión de los viroides a partir de parcelas con árboles infectados (Salazar, 1989).

El saneamiento por cultivo de meristemos combinado con termoterapia, tiene una amplia utilización para la eliminación de virus. Sin embargo, debido a que los viroides son capaces de replicarse y acumularse en los tejidos del hospedante a altas temperaturas, no pueden ser eliminados por tratamiento de calor. Esto condujo al desarrollo del tratamiento en frío antes de la escisión de los meristemos. El procedimiento, aunque lento, permite recuperar clones valiosos infectados con viroides que de otra manera serían eliminados (Salazar, 1995).

Para garantizar la calidad sanitaria de las plantas procedentes de programas de saneamiento, para el control rutinario de los árboles de distintos bloques de multiplicación de plantas de vivero y para la importación de material vegetal procedente de otros países, es imprescindible disponer de métodos de diagnóstico que deben ser sensibles y detectar todos los viroides descritos hasta el momento (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Análisis de secuencias y predicción de estructuras secundarias de variantes del HSVd

3.1.1. Caracterización molecular de variantes del HSVd presentes en dos aislados de cítricos cubanos

Fuente de viroides

La caracterización molecular de variantes del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) se realizó a partir de dos aislados de viroides cubanos, previamente caracterizados desde el punto de vista biológico, y en los cuales se había detectado la presencia del HSVd mediante electroforesis secuencial en geles de poliacrilamida (sPAGE) y por hibridación de ácidos nucleicos (NASH) (Velázquez *et al.,* 2002; 2003). El material vegetal de cítricos conteniendo a los aislados, así como la información concerniente a la caracterización biológica, fueron gentilmente cedidos por el DrC. Romualdo Pérez, de la Unidad Científico Base (UCTB) Jagüey Grande, Matanzas, y por el Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical (IIFT).

Uno de ellos, el aislado **PM 26-X**, fue obtenido originalmente de Toronjo Frost Marsh (*Citrus paradisi* Maca.)/*Citrus macrophylla* Wester*,* y está caracterizado como causante de cachexia acusada, dado los síntomas severos que causa en plantas de clemelin 11-20 (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. X *Citrus sinensis* L. Osb.), indicadora para la presencia de variantes del HSVd inductoras de cachexia (Pérez *et al.,* 1992); este aislado no provoca síntomas en plantas de cidro (*Citrus medica* L.) Etrog Arizona S-1. Por otra parte, el aislado **CL-1324**, originalmente obtenido de clementito (*Citrus reticulata* Blanco x *Citrus aurantium* L.)/Citrange Troyer (*Citrus sinensis* L. x *Poncirus trifoliata* L. Raaf.), no causa síntomas típicos de variantes del HSVd causantes de cachexia en clemelin 11-20, mientras que en plantas de cidro Etrog Arizona S-1 se manifiestan síntomas moderados.

La caracterización molecular del aislado **PM 26-X**, se realizó a partir de tres hospedantes diferentes: plantas de cidro (*Citrus medica* L.); lima persa (*Citrus latifolia* Tan.) injertada sobre *Citrus macrophylla* Wester y plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Japonés); mientras que en el caso del aislado **Cl-1324**, la caracterización molecular se realizó sólo a partir de plantas de cidro. Las plantas fueron previamente inoculadas por injerto y mantenidas bajo condiciones de casas de mallas por un período de 8-9 meses.

En el caso de las plantas de pepino utilizadas en la caracterización molecular del aislado PM 26-X, estas se inocularon a partir del extracto final (Semancik *et al,.* 1975) obtenido de cidro infectado con este aislado. La inoculación se realizó cuando las plantas contaban con la primera hoja verdadera y el procedimiento de inoculación fue mecánico, provocando pequeñas heridas en el tallo de la planta con el uso de una cuchilla previamente desinfectada en solución de hipoclorito de sodio al 1 %. Sobre estas heridas se aplicaron 10 µl del extracto que contenía al inóculo y se cubrieron con varias capas de cinta plástica adhesiva *(parafilm)*. Las plantas se mantuvieron en condiciones de casas de malla por un período de 21 días, al cabo del cual se les realizó la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos

A las plantas se les realizó la extracción de ácidos nucleicos, según lo descrito por Semancik *et al* (1975). En el caso de las plantas de cítricos se utilizaron tallos y hojas jóvenes, mientras que para las plantas de pepino se emplearon las hojas superiores. Se tomaron 5 gramos de tejido vegetal y se homogeneizaron en un volumen de 5 ml de tampón de extracción (tris hidroximetil aminometano, Tris-HCL 0.4M, pH 8.9; sulfato dodecyl de sodio, SDS 1% (p/v); ácido etilendiamino-tetra-acético, EDTA 5mM, pH 7.0; β-mercaptoetanol 4% (v/v) y 15 ml de fenol saturado en agua). Los ácidos nucleicos totales se fraccionaron en cloruro de litio (LiCl) 2M y la fracción soluble se concentró por precipitación con etanol, y se resuspendió en tampón TKM (Tris-HCl 10mM; cloruro de potasio, KCL 10mM; cloruro de magnesio, $MgCl_2$ 0.1mM; pH 7.4).

3.1.1.1. Análisis del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (SSCP)

Síntesis y clonaje del ADN

Para la obtención del fragmento de ADN de doble cadena que correspondiese a una unidad completa del HSVd se realizó la reacción en cadena de la polimerasa, previa transcripción inversa (siglas en inglés RT-PCR) según el procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (2004). La síntesis de la cadena complementaria se realizó mediante el uso del cebador específico del HSVd Vp19 (5´-GCCCCGGGGCTCCTTTCTCAGGTAAG-3´), complementario a las bases 60 a 85 (Astruc *et al*., 1996). Como paso previo se desnaturalizaron 2.5 μl del extracto de ácidos nucleicos en presencia de este cebador a 85ºC durante 3 min., luego la temperatura se bajó lentamente a 45ºC, disminuyendo 2ºC por min. Posteriormente se añadió el resto de los componentes de la mezcla (1 μM de dNTPs y 2 U de la enzima transcriptasa inversa del virus de le leucemia murina (M-MLV, *Promega*) y se mantuvo a 42ºC durante 45 min., seguido de un calentamiento a 90ºC por 3 min. para la inactivación de la enzima.

La síntesis de la cadena homóloga y la posterior amplificación del ADN se realizaron con los cebadores Vp19 y Vp 20 (5´-CGCCCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCC-3´), este último contiene las bases 78 a 102 de la secuencia del HSVd (Astruc *et al.*, 1996) (figura 7). La reacción de la PCR se realizó en un volumen de 50 μl adicionando 4 (l del producto de la RT a la mezcla de reacción, la cual contenía: MgCl2 1.5 mM, dNTPs 120 (M, 0.5 (M de cada uno de los cebadores y 1 U de Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones de PCR consistieron en un paso previo de desnaturalización durante 1 min. a 94ºC, seguido de 30 ciclos (40s a 94ºC, 40s a 60ºC y 1 min. a 72ºC), y un paso final de extensión de 5 min. a 72ºC. La síntesis del ADN del tamaño esperado se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Tris hidroximetil aminometano (Tris-HCl) 0.04M; ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA) 1mM; ácido bórico 0.04M; pH 8), a 100V de voltaje constante. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de □etidio (Sambrook et al., 1989).

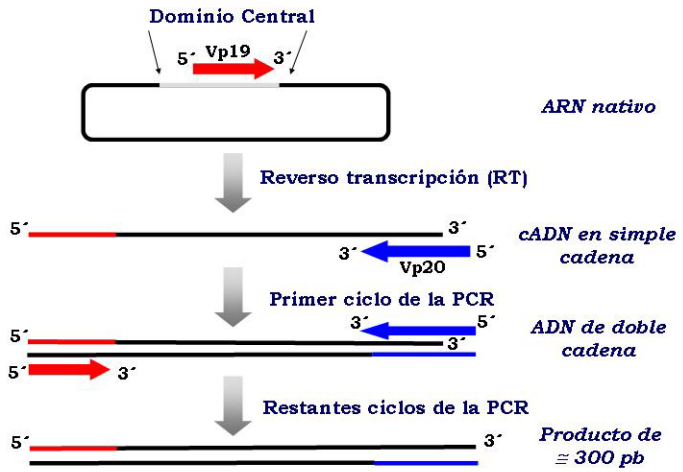


Figura 7: Esquema de RT-PCR para la amplificación del HSVd. En esta se representa el cebador complementario (Vp19) y el homólogo (Vp20).

El cebador complementario Vp19 y el homólogo Vp20 (Astruc *et al.,* 1996) contenían un único sitio de restricción *Sma I,* de esta manera, los productos de la RT-PCR se digirieron con la enzima de restricción *SmaI* (*Promega*) durante 2 horas a 25ºC (manual suministrado por el productor).

Para recuperar el producto de la digestión se realizó un tratamiento con igual volumen de fenol/cloroformo, y posteriormente se precipitó el sobrenadante con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M y 3 volúmenes de etanol absoluto. Una vez resuspendido el precipitado final en agua, se verificó la eficiencia de la recuperación mediante electroforesis de agarosa al 2%. Este producto se ligó en el plásmido vector pUC18 a 14ºC durante 16 horas (para ello se utilizó el juego de reactivos *Ready to go* pUC18 SmaI/BAP + ligase, Pharmacia Biotech). La transformación se realizó por choque térmico en *Escherichia coli* cepa DH5α (Sambrook *et al.,* 1989) y las colonias transformadas se

evaluaron por PCR, utilizando las mismas condiciones descritas anteriormente para comprobar la presencia del inserto en los plásmidos (Palacio-Bielsa *et al.,* 2004).

Polimorfismo conformacional de ADN monocatenario (SSCP)

Los productos de la PCR a partir de más de 30 clones individuales del HSVd, obtenidos para cada uno de los hospedantes, se caracterizaron mediante el análisis del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (SSCP), siguiendo lo descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (2004). Para ello se tomaron alícuotas de 2 μl del producto de la PCR y se mezclaron con 27 μl de solución de desnaturalización (90% formamida desionizada, EDTA 25mM, 0.05% xileno-cianol, 0.05% azul bromofenol y 16.6 % glicerol). Esta mezcla se calentó a 100°C durante 10 min., luego se pasó rápidamente a hielo y al cabo de 5 min. el ADN parcialmente desnaturalizado se aplicó a un gel de poliacrilamida (8.5x7x0.1 cm) al 14% que contenía un 5 % de glicerol. La corrida electroforética se realizó en tampón TBE (Tris-Borato 89 mM; EDTA 2 mM; pH 8.3) a voltaje constante de 200V y a 4ºC. La corrida electroforética se detuvo pasados 15 min. que el colorante xileno-cianol saliera del gel. Las bandas del ADN se visualizaron mediante tinción con plata (Igloi, 1983) y se identificaron los perfiles electroforéticos.

3.1.1.2. Análisis de secuencias

A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis del SSCP, se seleccionaron clones que mostraron el perfil más frecuente en la población, así como otros menos representativos para su secuenciación. Los insertos del ADN clonado se secuenciaron con el secuenciador ABI PRISM ADN 377 (Perkin-Elmer), en la Universidad Politécnica de Valencia, España, y para ello se utilizaron los cebadores específicos al promotor del bacteriófago M13 (5´- d)GTTTTCCCAGTCACGAC)-3´ y 5´-d(CAGGAAACAGCTATGAC)-3´.

Para el análisis de cada población se realizaron alineamientos múltiples de las secuencias con el programa Clustal X, versión 1.75 (Thompson *et al.,* 1994) y se compararon, además, con otras variantes del HSVd informadas en la base de datos que agrupa a las entidades subvirales (**www.subviral.med.uottawa.ca** , Pelchat *et al.,* 2003). El cálculo de las distancias filogenéticas se realizó según Jukes y Cantor (1969), y la construcción de los árboles filogenéticos se hizo mediante el método del *vecino más cercano* (Saitou y Nei, 1987), con un valor de re-muestreo (del inglés *bootstrap*) de 1500, mediante el empleo del programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA, versión 3.0, Tamura y Kumar, 2002). Las variantes del HSVd obtenidas de los aislados cubanos, que resultaron diferentes entre sí, se introdujeron en la base de datos GenBank del Centro Nacional para la Información de la Biotecnología (NCBI) y en la base de datos que agrupa las entidades subvirales referida anteriormente.

Para el análisis de los alineamientos y las construcciones de árboles filogenéticos, previamente se realizó la identificación de la presencia en el dominio variable de las secuencias motivos características para las variantes no causantes de cachexia (CVd-IIa) y para las patogénicas (CVd-IIb) (Reanwarakorn y Semancik, 1998), de forma tal que permitiera establecer relaciones con el carácter patogénico o no de estas.

Las poblaciones viroidales obtenidas a partir del aislado patogénico PM 26-X en los tres hospedantes en estudio, se compararon mediante un ensayo de comparación de proporciones múltiples (SCP, versión 2.1, CENSA*soft*, 1998) en cuanto a la fracción de cambios específicos de variantes CVd-IIa y CVd-IIb. Para ello se adoptó como criterio que el máximo de cambios posibles específicos de cada población correspondía al múltiplo de cinco (por ser el número de cambios involucrados en la secuencia motivo) por la cantidad de clones secuenciados.

3.1.2. Predicción y análisis de estructuras secundarias

3.1.2.1. Análisis de estructuras secundarias predichas en variantes del HSVd de dos aislados de cítricos cubanos

A las secuencias del HSVd obtenidas en este trabajo se les realizó la predicción de las estructuras secundarias de mínima energía libre a 37ºC mediante el programa MFOLD (versión ARN circular, **www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold**, Zuker *et al.,* 2003). Estas estructuras se compararon en dependencia del carácter de patogenicidad del aislado del cual provenían, y en el caso del aislado patogénico PM 26-X se tuvo en cuenta el hospedante de origen de las tres poblaciones analizadas.

3.1.2.2. Identificación de grupos conformacionales por dominios en las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd informadas en base de datos

Se tomaron las secuencias de las variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) citada en el acápite 3.1.1.2, y se les realizó la predicción de la estructura secundaria de mínima energía libre a 37ºC, según el programa referido en el acápite 3.1.2.1. En el momento de la toma de datos, septiembre de 2004, en la base habían informadas 171 secuencias del HSVd, en nueve hospedantes, con longitudes de secuencias que varían entre los 294 y 303 nucleótidos (tabla 4). En el caso del hospedante cítrico ya estaban incluidas las variantes de secuencias obtenidas en este trabajo.

Las estructuras secundarias obtenidas para cada variante del HSVd se compararon de manera individual por cada uno de los dominios funcionales y estructurales descritos en la molécula de este tipo de viroide (Keese y Symons, 1985), de manera que permitiera establecer una relación entre la adopción de los grupos conformacionales identificados y el hospedante del cual fueron aislados.

Tabla 4. Variantes de secuencias del HSVd informadas en la base datos (Pelchat *et al.,* 2003) utilizadas en la comparación de las estructuras secundarias.

Hospedante	No. de sec. informadas	Cantidad de variantes según la longitud de las secuencias									
		294	295	296	297	298	299	300	301	302	303
Cítrico	96 (88)[1]	2	15	5	6	7	16	8	7	15	7
Almendro	2	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
Albaricoque	25	1	1	1	11	4	6	1	-	-	-
Pepino	2	-	-	-	-	-	-	-	1	1	-
Vid	22 (19)[1]	1	-	4	10	4	-	-	-	-	-
Lúpulo	8	-	-	1	6	-	-	-	-	-	1
Ciruelo	14	-	-	12	-	2	-	-	-	-	-
Limón rugoso	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Papa silvestre	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total de secuencias analizadas	**160**	5	16	25	33	17	22	9	8	16	9

[1]El número entre paréntesis indica la cantidad de secuencias analizadas. En el caso del hospedante cítrico no se tuvieron en cuenta las secuencias correspondientes con las identificaciones de la base datos HSVd.cit36 a la HSVd.cit39 (todas de longitud de 318 nt), por contener errores (Duran-Vila, comunicación personal, 2004). Para este hospedante tampoco se tuvo en cuenta las variantes informadas del aislado PM 26-X en pepino (obtenidas en este trabajo) porque no constituyen variantes que de forma natural estaban infectando a plantas de pepino. En el hospedante vid no se analizaron las secuencias correspondientes con las identificaciones de la base datos HSVd.g20 a la HSVd.g22, pues a pesar de estar incluidas en la sección del HSVd, estas aparecen referidas en la base de datos como variantes del viroide de la vid (GYSVd), con una longitud de 368 nt, y muestran un porcentaje de homología con las variantes del HSVd inferior al 90%.

Para probar la significación de las diferencias halladas en la adopción de determinadas conformaciones de la estructura secundaria, se aplicó una prueba de comparación de proporciones múltiples (SCP, versión 2.1, CENSA*soft*, 1998). Se realizó además, un análisis de conglomerados por el método UPGMA (del inglés, *unweighted pair-group average*) y los porcentajes de disimilaridad se calcularon según la distancia euclideana (SCP, versión 2.1, CENSA*soft*, 1998).

3.2. Relación entre cambios en la molécula del HSVd y la replicación y movimiento del viroide en plantas de pepino

Este ensayo se realizó con el objetivo de evaluar la posible implicación que puedan tener cambios en la estructura secundaria del HSVd, sobre la expresión de determinadas propiedades biológicas de este viroide, como la replicación, movimiento a larga distancia en la planta y la inducción de síntomas en plantas de pepino.

Selección de clones

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización molecular del aislado PM 26-X en cidro, se seleccionaron cuatro clones del HSVd que mostraron secuencias diferentes entre sí, con una implicación sobre la predicción de la estructura secundaria.

Los plásmidos portadores del ADN correspondiente a las variantes del HSVd seleccionadas se purificaron a partir las células de *Escherichia coli* transformadas; la purificación se realizó a gran escala según el protocolo descrito por Sambrook *et al*. (1989). Este procedimiento consiste, básicamente, en el crecimiento de las células en 100 ml de medio de cultivo LB (triptona 1%; cloruro de sodio, NaCl 0.5%; extracto de levadura 0.5%), selectivo con presencia de ampicillina (100 μg/ml); la ruptura celular en condiciones alcalinas con el empleo de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.2N/SDS 1%; precipitación de los ácidos nucleicos; tratamiento con fenol/cloroformo y una precipitación y resuspensión final de los ácidos nucleicos en 100μl de TE 1X (tris 10 mM; EDTA 1mM). La verificación de la calidad de los plásmidos obtenidos se realizó mediante electroforesis en agarosa al 0.8% y la concentración se determinó a través de la medida de la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm (Ultrospec 2100 pro, *amersham pharmacia biotech*) (Sambrook *et al.,* 1989).

Inoculación en plantas de pepino

Se tomaron alícuotas de cada plásmido seleccionado correspondientes a 1 μg del inserto de ADNc de la variante del HSVd y se inocularon plantas de pepino *(Cucumis sativus* L. cv. Japonés), cuando ya contaban con la primera hoja verdadera. El procedimiento de inoculación fue mecánico según se describe en el acápite 3.1.1. Se utilizaron como controles negativos plantas no inoculadas las cuales, conjuntamente con las plantas inoculadas, se mantuvieron en condiciones de casa de malla a temperatura ambiente durante el tiempo en que se mantuvo el experimento. Para cada tiempo a evaluar se utilizaron dos plantas de pepino por cada clon seleccionado y dos plantas como controles negativos.

- **Evaluación de la replicación y movimiento a larga distancia en plantas de pepino**

Para evaluar la replicación de cada clon y el movimiento a larga distancia, se tomaron muestras de todas las hojas de las plantas a diferentes tiempos posinoculación: 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas, y a los 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 17 días. A partir de ellas se evaluó la presencia del HSVd mediante la hibridación de ácidos nucleicos (NASH) según se describe más adelante. Se examinó la aparición y evolución de los síntomas por observación durante 25 días.

Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos se realizó según el procedimiento modificado descrito por Querci *et al.* (1995). Este procedimiento fue descrito inicialmente para la detección del viroide del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd) mediante la hibridación de ácidos nucleicos, y como principio se basa en

la extracción directa de los ácidos nucleicos totales con el empleo de un tampón que contiene formaldehído para evitar el paso de desnaturalización previa a la hibridación de ácidos nucleicos. Para ello se tomaron 0.5g de tejido foliar, a los cuales se les añadió 1 ml de solución de extracción (formaldehído 18.2 % y SSC5.06X (NaCl 0.7M y citrato de sodio 0.07M)) y se homogeneizaron en mortero. Luego se transfirió el homogeneizado a un tubo de microcentrífuga y se centrifugó durante 5 min. a 12 000 rpm a temperatura ambiente. En este caso se obvió el tratamiento con fenol así como la posterior precipitación con etanol, lo cual constituyó la modificación realizada al procedimiento original. Las preparaciones de ácidos nucleicos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Detección del HSVd mediante hibridación de ácidos nucleicos (NASH)

Se tomaron 100µl de la fase acuosa de los extractos de ácidos nucleicos y se aplicaron sobre membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), utilizando un equipo en formato de *dot-blot* conectado al vacío. Las membranas se expusieron a 80°C durante dos horas para fijar los ácidos nucleicos.

Como controles positivos para los ensayos de NASH se utilizaron plásmidos que contenían un inserto monomérico del HSVd, obtenidos y secuenciados durante los ensayos de caracterización molecular de los aislados de cítricos cubanos, lo cual se describe en el acápite 3.1. Previo a su aplicación sobre las membranas estos se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100ºC y luego se mantuvieron en hielo.

La sonda de ácidos nucleicos utilizada consistió en un fragmento de ADN de doble cadena, correspondiente a un monómero del HSVd al cual se le incorporó la digoxigenina (DIG, *Roche*) como marcador no radiactivo. El método de marcaje empleado consistió en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según describe Palacio-Bielsa *et al.,* 2004, lo cual se especifica en el acápite 3.1.1.1. La diferencia en el contenido de la mezcla de la reacción consistió en que en este caso se añadieron 5mM de dUTP-DIG (Boehringer Mannheim). La concentración de ADN se determinó mediante la medida de la densidad óptica a 260 nm de longitud de onda (Ultrospec 2100 pro, *amersham pharmacia biotech*) (Sambrook *et al.,* 1989).

La NASH se realizó según lo describe Palacio-Bielsa *et al.* (2004). Para la prehibridación se añadieron, por cada 100cm^2 de membrana, 10 ml de una solución que contenía 50% formamida; 0.5% SDS; 6X SSPE (0.87M NaCl; 0.03M $NaH_2PO_4H_2O$; 5.94mM EDTA pH7.4), solución Denhardt 5X (0.1% Ficoll; 0.81% polivinilpirrolidona; 0.1% albúmina de suero bovino) y 10mg de ADN de esperma de salmón desnaturalizado por calor. Las membranas se mantuvieron en esta solución a 50°C durante dos horas.

La hibridación se realizó añadiendo, por cada 100cm^2 de membrana, 10 ml de una solución que contenía 50% formamida; 5% SDS; 6X SSPE (0.87M NaCl; 0.03M $NaH_2PO_4H_2O$; 5.94mM EDTA pH 7.4), 10mg de ADN de esperma de salmón y 10μg de sonda de ADN marcada con DIG. Tanto el ADN de esperma de salmón como la sonda se desnaturalizaron por calor previo a ser aplicados a la solución de hibridación. Las membranas se mantuvieron hibridando durante 16 horas a 50°C.

Al concluir el tiempo de hibridación se realizaron dos lavados a temperatura ambiente durante 15 min. en SSC 2X (0.29M NaCl; 0.03M citrato de sodio, pH7) y 0.1% SDS, y un lavado a 60(C por una hora con SSC 0.1X (0.014M NaCl; 1.5mM citrato de sodio, pH7) y 0.1% SDS.

Finalmente, se realizó la detección de los híbridos marcados por detección quimioluminiscente, con el empleo de un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina (fragmentos Fab), siguiendo el procedimiento descrito adjuntado por el productor (Boehringer Manneheim). Como sustrato de la enzima se utilizó el compuesto quimioluminiscente CSPD (3-(4-metoxispiro{1,2-dioxetano-3,2´-(5´-cloro) triciclo[3.3.2.13,7] decan}-4-il) fenil fosfato (Roche). La visualización de los híbridos se realizó mediante la exposición de láminas X-omat (KodaK) a 37°C durante 1 hora.

La intensidad de la señal de hibridación de cada muestra se estableció mediante la medida de la densidad óptica, utilizando un densitómetro (BIORAD) y mediante el programa Molecular Analyst, BIORAD, versión 4.1.2. Los resultados obtenidos se compararon por un análisis de varianza no paramétrica por el método de Kruskal-Wallis (SAS, 2001), debido al no cumplimiento de los supuestos de un ANOVA.

3.3. Detección diferencial y diagnóstico de variantes cítricas del HSVd

3.3.1. Diferenciación de variantes patogénicas o no mediante RT-PCR

Primeramente se realizó el diseño de dos cebadores homólogos, sobre la base de las diferencias de secuencia identificadas en la cadena superior del dominio variable del HSVd en cítrico que distinguen a las variantes no patogénicas, CVd-IIa, y las causantes de cachexia, CVd-IIb (Palacio-Bielsa, 1999). Estos fueron: el iniciador IIa (5´-GAATCCAGCCAGAGGCGTA-3´), homólogo a los nucleótidos 95-113 de la variante CVd-IIa y el iniciador IIb (5´-GAATCCAGCGGGGGCGTG-3´), homólogo a los nucleótidos 97-113 de la variante CVd-IIb. Como parejas de ambos cebadores se utilizó el complementario Vp19, descrito en el acápite 3.1.1.1. Para estas parejas de cebadores se esperó tallas del producto de amplificación con muy pequeñas variaciones; de manera específica para la pareja Vp19-IIa la talla esperada fue de 287-292 nt, mientras que para la pareja VP19-IIb fue algo inferior, 284-290nt (figura 8).

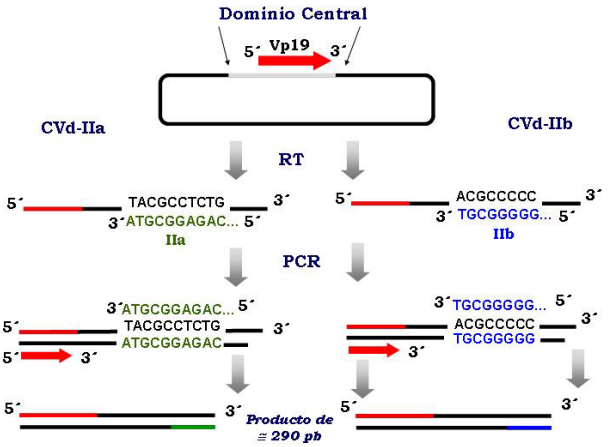


Figura 8: Esquema de RT-PCR para la amplificación diferenciada de las variantes CVd-IIa y CVd-IIb. En verde se distingue el fragmento del cebador IIa que difiere del cebador IIb representado en azul.

Para estos cebadores se calcularon los parámetros de especificidad, formación de estructuras en forma de ganchos de pelo, y formación de dímeros en el extremo 3´ terminal con el cebador pareja, mediante el programa Oligo (versión 6.31, Wojciech y Piotr Rychlik, 1989-2000).

Los ensayos se realizaron a partir de 6 aislados de viroides y 16 clones del HSVd pertenecientes a la colección de viroides del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España, los cuales fueron gentilmente puestos a disposición por las Dras. Nuria Duran-Vila y Ana Palacio-Bielsa. Los seis aislados empleados estaban caracterizados desde el punto de vista biológico, como causantes de cachexia, y en ellos los estudios moleculares permitieron la identificación de la presencia de variantes de CVd-IIb (Palacio-Bielsa, 1999). La identificación de estos aislados se corresponden con las siguientes denominaciones: X-715; X-713; X-707; X-710; X-704 y EX-5-4. De los 16 clones utilizados, 9 contenían en el dominio V la secuencia motivo característica de CVd-IIa y 7 la de CVd-IIb.

En el caso de los aislados de viroides, el material de partida fueron plantas de cidro inoculadas y mantenidas en el invernadero (IVIA), a las que se les realizó la extracción de ácidos nucleicos (Semancik *et al.,* 1975); mientras que para los clones la extracción de los plásmidos que contenían la secuencia completa de las variantes del HSVd se procedió según se describe en el acápite 3.1.1.1.

La amplificación del ADN, tanto de los productos de la RT de los extractos como de los cultivos líquidos de los clones, se realizó utilizando la misma composición de la mezcla de la reacción descrita en el acápite 3.1.1.1. La optimización del programa a utilizar para cada pareja de cebadores se realizó mediante modificaciones de la temperatura y tiempo del paso de hibridación de los iniciadores al ADN molde, a partir del programa descrito en el acápite referido anteriormente, que consistieron en: 60°C durante 60s; 70°C durante 40s y 70°C durante 20s. La síntesis del ADN del tamaño esperado se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Sambrook *et al.,* 1989). El cálculo de las energías libres (dG) de los híbridos formados por los cebadores con el ADNc molde se realizó con el programa *2-state hybridization server* (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/form6.cgi) y para la predicción de su

estructura secundaria se utilizó el programa *DNA mfold server* (www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna) (Zuker, 2003).

Para ambas parejas de cebadores se realizó PCR *in silico* con el empleo del programa Oligo (versión 6.31, Wojciech y Piotr Rychlik, 1989-2000). Se determinó el número de eficiencia del apareamiento del cebador (siglas en inglés P.E.), el cual es una formulación establecida por este programa que cuantifica la probabilidad que tiene un oligonucleótido determinado para hibridar en un sitio específico del molde. Según se establece, valores de P.E. de 210, o mayores, indican que puede resultar un apareamiento durante la PCR, mientras que un valor de P.E. de 170 es el límite inferior aproximado para tal apareamiento (o falso apareamiento). Los valores de P.E, comprendidos en el rango de 170-210 pueden resultar en una PCR con menor eficiencia que cuando está por encima de 210.

Por esta técnica se analizaron 92 variantes de secuencia del HSVd en cítricos informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003). No se ensayaron las variantes correspondientes con las denominaciones HSVd.cit36 hasta la 39, ya que estas contienen errores (Duran-Vila, comunicación personal, 2005). Para este análisis se tuvo en cuenta la identificación de la presencia en el dominio variable de las secuencias motivos características para CVd-IIa y CVd-IIb (Reanwarakorn y Semancik, 1998) realizada en el acápite 3.1.1.2.

3.3.2. Establecimiento de un método de diagnóstico con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio

Material vegetal y extracción de ácidos nucleicos

En todos los ensayos realizados se utilizaron dos tipos de material vegetal a partir de cítricos: plantas de Pomelo Marsh (*Citrus paradisi* Macf.) sobre *Citrus macrophylla* Wester provenientes de un campo en el que previamente se determinó la presencia de cachexia en porcentajes elevados (Pérez, 2004a) y plantas del patrón *Citrus volkameriana* Ten y Pasq., inoculadas con aislados que contenían a CVd-IIb en ensayos realizados en la Unidad Científica Técnica Base (UCTB) en Jagüey Grande, Matanzas. Se emplearon además plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv. Japonés) las cuales se mantuvieron en casas de malla.

Como controles negativos se emplearon plantas sanas de clemelín 11-20 (*Citrus clementina* Hort. Ex Tan. X *Citrus sinensis* L. Osb.) injertadas sobre cidro (*Citrus medica* L.) , plantas de cidro y de pepino cv. Japonés. La cantidad de controles y muestras utilizadas en los diferentes experimentos se detallan en el curso de este acápite. La extracción de ácidos nucleicos se realizó siguiendo el método descrito por Semancik *et al.* (1975), referido en el acápite 3.1.1.

Inoculación en plantas de pepino y extracción de ácidos nucleicos

Los extractos obtenidos a partir de las plantas de cítricos se utilizaron para inocular plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Japonés). La inoculación se realizó de manera mecánica lo cual se describe en el acápite 3.1.1. Por cada extracto a analizar se inocularon dos plantas de pepino. Como controles negativos se emplearon plantas no inoculadas las cuales conjuntamente con las plantas inoculadas, se mantuvieron en condiciones de casa de malla a temperatura ambiente, por un período de 25 días, y durante este tiempo se observó la posible aparición de síntomas. La extracción de ácidos nucleicos se realizó según el procedimiento descrito por Querci *et al.* (1995) modificado según se refiere en el acápite 3.2.

Detección del HSVd mediante hibridación de ácidos nucleicos (NASH)

Los extractos de ácidos nucleicos se aplicaron sobre membranas de nylon cargadas positivamente (Boehringer Mannheim), utilizando un equipo en formato de *dot-blot* conectado al vacío. La NASH se realizó según lo describe Palacio-Bielsa *et al.* (2004), referido en el acápite 3.2. En el caso de los extractos de las plantas cítricas, previo a la aplicación en la membrana se desnaturalizaron 20 µl de estos en una solución que contenía 12µl de SSPE 20X (cloruro de sodio, NaCl 2.9M; di-hidrógeno fosfato de sodio mono-hidratado, $NaH_2PO_4H_2O$ 0.1M; EDTA 19.8mM) y 8µl de formamida, se mantuvieron a 60ºC durante 15 minutos y posteriormente se pasaron a hielo. Por su parte, de los extractos de las plantas de pepino se aplicaron directamente sobre la membrana 100µl de la fase acuosa. Las membranas se expusieron a 80°C durante dos horas para fijar los ácidos nucleicos.

Como controles positivos para los ensayos de NASH se utilizaron plásmidos que contenían un inserto monomérico del HSVd, obtenidos y secuenciados durante los ensayos de caracterización molecular de los aislados de cítricos cubanos, lo cual se describe en el acápite 3.1.1. Previo a su aplicación sobre las membranas estos se desnaturalizaron durante 10 minutos a 100ºC y luego se mantuvieron en hielo.

Adicionalmente, se evaluó el efecto de la toma de muestras y el tiempo posinoculación sobre la intensidad de señal de la NASH en la detección del HSVd. En tal sentido, se analizaron plantas de pepino inoculadas con extractos de ácidos nucleicos a partir de 15 plantas de cítricos provenientes de campo y 14 del patrón *C. volkameriana* Ten y Pasq. En el caso de estas últimas, se tomó como fuente de inóculo material vegetal de diferentes zonas de la planta (inferior, medio y superior). Para determinar la influencia del tiempo posinoculación (PI) en relación con la posición de la hoja de las plantas de pepino inoculadas, los extractos de ácidos nucleicos fueron analizados por hibridación de ácidos nucleicos a los 9, 14 y 21 días PI, y en todos los casos se muestrearon las hojas inferior y superior verdaderas de cada planta.

Para el análisis de los resultados de las plantas de pepino inoculadas con los extractos de ácidos nucleicos de cítricos provenientes de campo, se determinó la intensidad de la señal de NASH mediante la medida de la densidad óptica, utilizando un densitómetro (BIORAD) y el programa *Molecular Analyst,* BIORAD, versión 4.1.2, Los valores obtenidos se compararon mediante una prueba *t* de *Student* (CENSA*soft*, 1998) de muestras independientes. En el caso de las plantas de pepino inoculadas con extractos de plantas de *C. volkamerina* se compararon las fuentes de inóculo que

resultaron positivas mediante una prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998).

A partir del análisis de los resultados obtenidos se definieron las condiciones que permitieron una mejor detección del viroide y se elaboró una propuesta de metodología de diagnóstico.

Comparación de la metodología propuesta con métodos de referencia para la detección del HSVd

La comprobación de los resultados obtenidos mediante la metodología propuesta se realizó a partir de 15 muestras de cítricos empleando dos métodos de referencia. En el primero de los métodos de referencia (Pérez, 2004a; Velázquez, 2004), cada muestra de campo fue inoculada por injerto en dos plantas de clemelin 11-20 injertadas sobre cidro, las cuales se mantuvieron en condiciones de casa de mallas durante seis meses. Al cabo de este tiempo se evaluó la presencia de síntomas típicos de cachexia (Pérez *et al.,* 1992) y se les realizó la extracción de ácidos nucleicos (Semancik *et al.,* 1975) para su posterior análisis por NASH siguiendo el procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (2004).

En el segundo método de referencia, luego de la inoculación en las plantas de clemelín 11-20 como se describió anteriormente, la detección del HSVd se realizó mediante la reverso trascripción combinada con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), de acuerdo al procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (2004). La síntesis del ADN del tamaño esperado (aproximadamente 300pb) se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 0.5X (Tris-HCl 0.04M; EDTA 1mM; ácido bórico 0.04M; pH 8), a 100V de voltaje constante. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (Sambrook *et al.,* 1989).

Paralelamente, las muestras fueron analizadas mediante la metodología de diagnóstico propuesta en este trabajo. Para ello se tomaron 5 gramos de material vegetal de diferentes zonas de la planta de cítricos, incluyendo la zona inferior, y se les realizó la extracción de ácidos nucleicos según lo descrito por Semancik *et al.* (1975). Los extractos obtenidos se inocularon de manera mecánica en plantas de pepino de la variedad Japonés cuando contaban con la primera hoja verdadera. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de casa de malla y a los 14 días posinoculación se tomaron muestras de sus hojas superiores para realizar la extracción de los ácidos nucleicos totales por el procedimiento modificado de Querci *et al.* (1995). Se realizó la NASH en formato *dot blot,* con sonda de ADN específica del HSVd marcada con digoxigenina, siguiendo el procedimiento descrito por Palacio-Bielsa *et al.* (2004). La evaluación de las señales de hibridación se realizó de manera cualitativa.

Evaluación de parámetros de desempeño

El límite de detección de la NASH a partir de los extractos de las plantas de pepino previamente inoculadas con muestras de campo se evaluó mediante diluciones seriadas: muestra pura, 1:10, 1:100 y 1:1000. Las evaluaciones se realizaron con cuatro controles positivos.

Para la definición de los parámetros de desempeño se evaluaron 52 controles positivos y 44 controles negativos (tabla 5), con cuyos resultados se calcularon los parámetros de desempeño del ensayo (tabla 6), siguiendo la metodología establecida por Peralta y Villoch (1999).

Parámetro	Ecuación*
Especificidad diagnóstica	D-SP= Vn/ (Vn + Fp)
Sensibilidad diagnóstica	D-SN= Vp/ (Vp + Fn)
Eficacia	E= (Vp + Vn) / (Vp+ Vn + Fp + Fn)
Valor predictivo de positividad	Vpp= Vp/ (Vp + Fp)
Valor predictivo de negatividad	Vpn= Vn/ (Vn + Fn)

Tabla 5. Descripción de los controles empleados para la determinación de los parámetros de desempeño de la metodología propuesta para la detección del HSVd en cítricos.

Controles positivos		**Controles negativos**	
Descripción de controles	**Cantidad**	**Descripción de controles**	**Cantidad**
Pomelo Marsh/*C. macrophylla* Wester	17	Clemelin 11-20/cidro	15
C. volkameriana Ten y Pasq.	35	Cidro	5
		Pepino cv. Japonés	24
Total	**52**	**Total**	**44**

Tabla 6. Parámetros de desempeño determinados para el ensayo, siguiendo la metodología establecida por Peralta y Villoch (1999).

* Donde: Vp: verdaderos positivos, Vn: verdaderos negatvos, Fp: falsos positivos y Fn: falsos negativos.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de secuencias y predicción de estructuras secundarias de variantes del HSVd

4.1.1. Caracterización molecular de variantes del HSVd presentes en dos aislados de cítricos cubanos

Como resultado de la RT-PCR a partir de los dos aislados del HSVd de cítricos cubanos analizados, se obtuvieron ADNs monoméricos del tamaño esperado (aproximadamente 300pb). El clonaje de los productos de la RT-PCR en vectores plasmídicos y su posterior transformación en *E. coli,* permitieron la obtención de colonias que contenían el inserto de interés. Para el aislado PM 26-X se recuperaron 48 clones a partir de cidro, 33 de lima y 50 de pepino; del aislado CL 13-24 se recuperaron 50 clones provenientes de cidro.

4.1.1.1. Análisis del polimorfismo conformacional del ADN monocatenario (SSCP)

La tabla 7 muestra los resultados obtenidos a partir del análisis individual del SSCP de los clones recuperados de los dos aislados del HSVd en cítricos cubanos a partir de cada hospedante. En todos los casos se identificaron diferentes perfiles de conformación, así como el perfil mayoritario.

Tabla 7. Perfiles del SSCP identificados para el HSVd y fracción del perfil mayoritario.

Aislado/Hospedante	No. de clones analizados	No. de perfiles del SSCP identificados	Clones que muestran el perfil mayoritario
PM 26-X			
♦ *C. medica* L. (cidro)	48	15	18/48
♦ *C.latifolia* Tan/ *C.macrophylla* Wester	33	12	12/33[1] 11/33

(lima)			
♦ *C. sativus* L. (pepino)	50	6	43/50
CL 13-24			
♦ *C. medica* L. (cidro)	50	5	45/50

[1] En este caso se identificaron dos perfiles mayoritarios.

En la figura 9 se muestran ejemplos de algunos de los perfiles conformacionales del ADN obtenidos en las poblaciones analizadas.

Como se puede apreciar en la tabla 7 y la figura 9, dentro de las poblaciones del HSVd estudiadas se observó la existencia de variabilidad, entre aislados diferentes y para el mismo aislado a partir de hospedantes diferentes, e incluso dentro del propio hospedante. En los hospedantes cítricos analizados se observó la mayor variabilidad en el aislado causante de cachexia PM 26-X, donde menos de la mitad de la población analizada mostró el perfil mayoritario. En el caso de las variantes obtenidas en lima, se observó la existencia de dos perfiles mayoritarios, en lugar de uno como en el resto de las poblaciones.

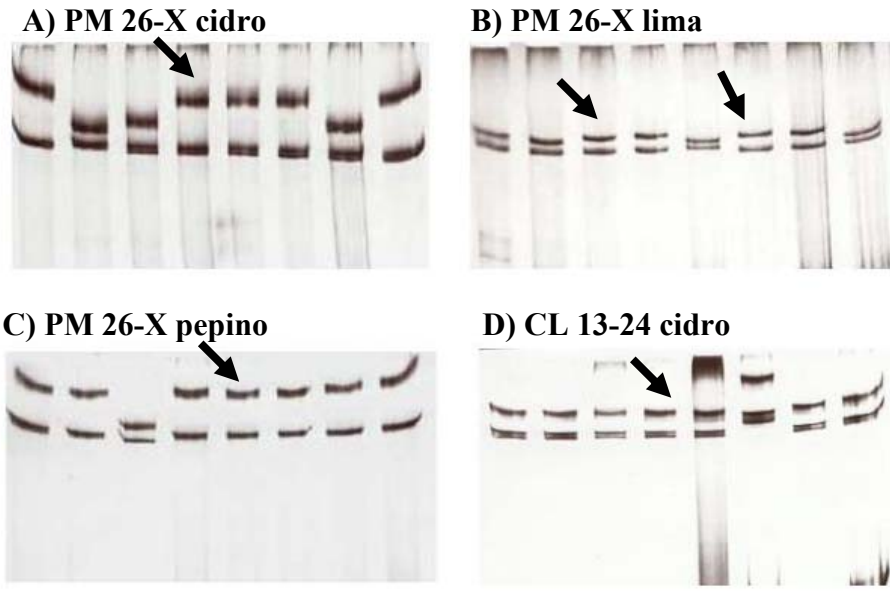


Figura 9: Ejemplos de perfiles de conformación del HSVd mediante el SSCP. **A:** aislado PM 26-X en cidro; **B:** aislado PM 26-X en lima; **C**: aislado PM 26-X en pepino; **D:** aislado CL 13-24 en cidro. Las flechas indican el perfil mayoritario. En el caso de la población del aislado PM 26-X en lima se indican los dos perfiles mayoritarios identificados

En el aislado CL 13-24 no causante de cachexia, la variabilidad fue inferior comparada con el aislado patogénico PM 26-X en los hospedantes cítricos, pues casi la totalidad de la población evidenció el perfil mayoritario. Este comportamiento fue similar al mostrado por el aislado PM 26-X en pepino.

4.1.1.2. Análisis de secuencias

Se determinó la variante de secuencia predominante en cada población (secuencia maestra), a partir de la secuenciación de clones que mostraban el perfil electroforético mayoritario en el SSCP y de las minoritarias obtenidas de los clones con perfiles diferentes a este. Se informaron un total de 27 secuencias a la base de datos GenBank, y automáticamente a la base de datos de ARN subvirales (Pelchat *et al.,* 2003), las cuales constituyen variantes nuevas en relación a las ya

informadas, excepto la de cl-c51 (procedente del aislado Cl 13-24) que resultó idéntica a la secuencia HSVd.cit54 de Japón (tabla 8).

El alineamiento de las secuencias obtenidas con las informadas en la base datos (Pelchat *et al.,* 2003) para el HSVd reveló más de un 93% de identidad entre ellas. Por otra parte, los alineamientos de las secuencias del HSVd presentes en cada población de los aislados cubanos analizados mostró que el porcentaje de identidad entre la secuencia maestra y el resto de las variantes fue superior al 94%, si bien se observaron diferencias entre las poblaciones. Las variaciones involucraron a la mayoría de los dominios funcionales descritos, aunque se observó mayor variación en los dominios variable y patogénico. Las regiones que mostraron un menor número de cambios fueron la terminal izquierda y central.

Tabla 8. Variantes del HSVd en cítricos obtenidas a partir de dos aislados cubanos.

Aislado/Hospedante	No. de secuencias diferentes encontradas	Código de la secuencia[1]	No. de accesión en GenBank (NCBI)	Denominación según Pelchat *et al*., 2003
PM 26-X				
♦ *C. medica* L. (cidro)	12	**26x-c2**	AY 379 540	HSVd.cit76
		26x-c18	AY 379 533	HSVd.cit69
		26x-c26	AY 379 534	HSVd.cit70
		26x-c23	AY 379 535	HSVd.cit71
		26x-c29	AY 379 536	HSVd.cit72
		26x-c13	AY 379 537	HSVd.cit73
		26x-c22	AY 379 538	HSVd.cit74
		26x-c45	AY 379 539	HSVd.cit75
		26x-c19	AY 379 541	HSVd.cit77
		26x-c11	DQ 014 514	-[2]
		26x-c33	DQ 014 515	-
		26x-c10	DQ 014 516	-
♦ *C. latifolia* Tan./ *C. macrophylla* Wester (lima)	6	**26x-l12**	AY 594 202	HSVd.cit091
		26x-l22m	AY 594 200	HSVd.cit090
		26x-l4	AY 594 201	HSVd.cit088
		26x-l33	AY 594 203	HSVd.cit089
		26x-l26	Igual a AY 379 540	HSVd.cit76
		26x-l28	DQ 014 517	-
♦ *C. sativus* L. (pepino)	4	**26x-p35**	AY 735 992	HSVd.cit095
		26x-p26	AY 735 991	HSVd.cit096
		26x-p44	AY 735 993	HSVd.cit093
		25x-p3	AY 735 994	HSVd.cit094
CL 13-24				
♦ *C. medica* L. (cidro)	6	**cl-c3**	AY 594 205	HSVd.cit084
		cl-c25	AY 594 206	HSVd.cit086
		cl-c19	AY 594 207	HSVd.cit087
		cl-c37	AY 594 208	HSVd.cit085

[1]: Nomenclatura dada en este trabajo para la identificación de los aislados; las siglas en negritas identifican a la secuencia maestra de la población. [2]: Pendientes a incorporar en la base de datos por motivos de la administración de la misma.

Las variantes de las poblaciones que mostraron mayor variabilidad por el SSCP (aislado PM 26-X en cidro y lima) conservaron los menores índices de identidad entre ellas, 94.6% y 96.1% respectivamente; mientras que en las poblaciones que mostraron menor variabilidad en el SSCP (aislado CL 13-24 en cidro y PM 26-X en pepino) tuvieron porcentajes de identidad superiores, 98.6% y 98.9% respectivamente. En el caso del aislado PM 26-X en lima, donde se había observado la existencia de dos perfiles electroforéticos mayoritarios en el SSCP, sólo se identificó una secuencia maestra.

A pesar de que se observó correspondencia entre las poblaciones del HSVd que mostraron mayor variabilidad por el SSCP y las que conservaron menores índices de identidad entre sus variantes, la secuenciación de clones seleccionados a partir de los perfiles electroforéticos observados evidenció que la heterogeneidad de la especie era mayor que la predicha por el SSCP. Aún cuando se encontraron secuencias idénticas entre sí que mostraban el perfil mayoritario, existían otras con variaciones en un pequeño número de nucleótidos e, igualmente, se encontraron secuencias idénticas que mostraban un perfil electroforético diferente.

- ***Análisis de las relaciones filogenéticas***

Primeramente, se estableció la presencia o no de la región motivo descrita en el dominio variable que distingue a las variantes patogénicas de aquellas que no lo son (Reanwarakorn y Semancik, 1998; Reanwarakorn y Semancik, 1999a; Palacio-Bielsa y Duran-Vila, 2000). Los resultados obtenidos al analizar las variantes informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003), incluidas las incorporadas a partir de este trabajo, mostró que de las 92 secuencias 30 contenían los cambios específicos de CVd-IIa (no inductor de cachexia), 49 los específicos de CVd-IIb (inductor de cachexia), mientras que las 13 secuencias restantes mostraban sólo algunos de los cambios propios de ambos tipos de secuencias. La tabla 9 especifica el agrupamiento de las variantes según este criterio.

Tabla 9. Agrupamiento de las variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003, www.subviral.med.uottawa.ca), según la presencia o no de secuencias específicas descritas en el dominio variable características de CVd-IIa y CVd-IIb.

Variantes del HSVd según la presencia de las distintas secuencias motivos en el dominio variable		
CVd-IIa	**CVd-IIb**	**Intermedias**
HSVd.cit: 01; 02; 03; 04; 05; 06; 07; 11; 32; 33; 34; 35; 40; 42, 43; 44; 45; 48; 49; 50;	HSVd.cit: 08; 088; 09; 091; 092[a]; 093; 094; 095[b]; 096; 10; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 21;	HSVd.cit: 083; 084; 085; 086; 087; 089[c]; 090; 41; 46; 54; 67; 80; 82

51; 52; 55; 56; 57; 59; 60; 62; 65; 81	22; 23; 24; 25; 26; 27; 28; 29; 30; 31; 47; 53; 58; 61; 63; 64; 66; 68; 69; 70; 71; 72; 73; 74; 75; 76; 77; 78; 79	
Total: 30	**Total: 49**	**Total: 13**

Los números representan la identificación asignada en la base de datos. Se subrayan las secuencias obtenidas en este trabajo y se destacan en rojo las que representan variantes nuevas. [a]: Variante idéntica a HSVd.cit091; [b]: Variante idéntica a HSVd.cit76; [c]: Variante idéntica a HSVd.cit084.

En el aislado no patogénico CL 13-24 se observó que la secuencia maestra tenía una longitud de 299nt y presentaba sólo tres de lo cinco cambios descritos para las variantes no causantes de cachexia. La comparación de la secuencia maestra del aislado CL 13-24 con otras variantes informadas en la base de datos, y en las cuales se identificó la presencia de la secuencia motivo específica para las variantes no inductoras de cachexia, reveló que esta representaba una nueva variante del HSVd. Los mayores porcentajes de identidad (99%) se mostraron con las variantes HSVd.cit07, HSVd.cit42 y HSVd.cit57, las cuales pertenecen a aislados tomados en diferentes regiones geográficas: California, Uruguay y Japón, respectivamente. Estas tres variantes igualmente provenían de aislados caracterizados desde el punto de vista biológico como no causantes de cachexia (Reanwarakorn y Semancik, 1999a; Ito *et al.*, 2002).

Los menores índices de identidad se hallaron con las variantes HSVd.cit65, HSVd.cit40 y HSVd.cit3 (97.1, 97.5 y 97.8% respectivamente), aunque de estas es insuficiente o nula la información que se brinda con respecto a origen geográfico y caracterización biológica. La variante HSVd.cit40 está descrita como no causante de cachexia, pero no se indica la zona geográfica de dónde fue aislada. Por su parte, la variante HSVd.cit65 fue aislada en Túnez y HSVd.cit3 en Israel a partir de plantas de toronjo, pero para ellas no está disponible la información referida a la capacidad o no de inducir cachexia.

Además de la secuencia maestra, en el aislado CL 13-24 se identificaron otras tres nuevas. De forma general, las variantes secuenciadas tenían una longitud entre 298-299 nucleótidos. Todas ellas presentaron algunos de los cinco cambios y/o deleciones de bases descritos en la región variable específicos para las variantes no causantes de cachexia. Sin embargo, en ninguno de los casos se presentaron la totalidad de los cambios descritos. En todas las secuencias, excepto una, se presentaron tres de los cinco descritos para las variantes del HSVd no causantes de cachexia; estos fueron: en el nucleótido 108 la presencia de una adenina (A) en lugar de una guanina (G), la inserción de una adenina (A) en el nucleótido 110 y la aparición de un uracilo (U) en lugar de citosina (C) en la posición del nucleótido 194.

Por otra parte, las secuencias maestras identificadas en el aislado PM 26-X a partir de los tres hospedantes analizados (cidro, lima y pepino) tuvieron una longitud de 295nt y presentaron la región motivo específica para las variantes inductoras de cachexia. Esto establece una relación directa entre la composición de la población de este aislado y su capacidad de causar síntomas de cachexia acusada

descritos previamente para el mismo. En cidro y pepino sus secuencias maestras fueron idénticas, mientras que en lima la única diferencia con respecto a estas fue un cambio de C por U en la posición 155, perteneciente a la cadena inferior del dominio terminal derecho.

En la figura 10 se muestra el árbol filogenético obtenido de la comparación de las secuencias maestras del aislado PM 26-X, con otras variantes del HSVd en cítricos informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) en las que se identificó la presencia de la secuencia motivo en el dominio variable específica para las variantes inductoras de cachexia. Como se observa, las secuencias maestras del aislado PM 26-X a partir de los tres hospedantes analizados se agrupan en la misma rama conjuntamente con secuencias informadas en diversas regiones del mundo.

En la tabla 10 se especifican los mayores y menores índices de identidad encontrados entre las secuencias maestras del aislado PM 26-X y las variantes informadas en la base de datos. Según se muestra ninguna de las secuencias maestras del aislado PM 26-X mostró un 100% de identidad con las informadas en la base de datos y no se identificó una relación directa entre los mayores índices de identidad entre ellas y el origen de las variantes informadas en la base datos. De hecho, en algunos casos la misma variante ha sido informada en regiones bien distantes, como por ejemplo California y la India (HSVd.cit9, HSVd.cit63, HSVd.cit64) o California y Japón (HSVd.cit20 y HSVd.cit47).

Tabla 10. Índices de identidad entre las secuencias maestras del aislado PM 26-X y variantes cítricas del HSVd de la base datos que contienen la secuencia motivo característica de variantes inductoras de cachexia.

Variante en base datos-Origen	**Comportamiento biológico**	**Identidad con las secuencias maestras del aislado PM 26-X en diferentes hospedantes (%)**	
Mayores índices de identidad con:		**Cidro y pepino**	**Lima**
HSVd.cit9[1] – California	Cachexia	**99.3**	98.9
HSVd.cit63[1] – India	Venas amarillas y corcho	**99.3**	98.9
HSVd.cit64[1] – India	Venas amarillas y corcho	**99.3**	98.9
HSVd.cit20[2] – California	Cachexia	**99.3**	98.9
HSVd.cit47[2] – Japón	Cachexia	**99.3**	98.9
HSVd.cit23 – ?	?	98.9	98.3
HSVd.cit21 – Córcega	Cachexia	98.9	98.6
HSVd.cit61 – Japón	Cachexia	98.9	**99.3**
HSVd.cit22 – California	Cachexia (X-707-2)	98.9	98.9
HSVd.cit24 – California	Cachexia (X-707-4)	98.9	98.6
Menores índices de identidad con:			
HSVd.cit25 – Córcega	Cachexia (X-701-M)	96.4	96.1
HSVd.cit10 – California	Cachexia suave (Ca-903)	96.4	96.1
HSVd.cit68 – Túnez	?	96.1	95.7
HSVd.cit15 – Córcega	Cachexia (X-701-3)	96.1	95.7
HSVd.cit66 – Túnez	?	**95.7**	**95.3**

[1], [2] Los mismos números indican secuencias idénticas entre sí; ?: datos no descritos en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

En el aislado PM 26-X, también se encontraron nuevas variantes diferentes a la secuencia maestra. En

este caso el análisis del alineamiento entre ellas resultó algo más complejo, pues se trató de secuencias provenientes de un mismo aislado pero a partir de hospedantes diferentes. Por lo tanto, los resultados obtenidos fueron analizados de manera enfocada hacia la búsqueda de evidencias del posible efecto de estos hospedantes sobre la selección de las secuencias en la población.

Las variantes de secuencias del HSVd en el aislado PM 26-X que presentaron longitudes de 294-295nt contenían los cinco cambios y/o deleciones descritos en el dominio variable de la estructura del viroide, característica para las variantes del HSVd que producen la cachexia de los cítricos, mientras que en el resto se manifestaron sólo algunos de los nucleótidos descritos en las variantes que no la provocan. Es importante destacar que, tanto el número de secuencias con un tamaño determinado como el hecho de contener o no los cambios a los que se ha hecho referencia, se comportó de manera diferente en dependencia de la planta hospedante en que se estudió la población. La tabla 11 compendia las principales características de las poblaciones del aislado PM 26-X provenientes de cada hospedante.

Tabla 11. Principales características de las poblaciones del aislado PM 26-X a partir de cidro, lima y pepino.

		Hospedante de origen del aislado PM 26-X		
Parámetros		**Cidro**	**Lima**	**Pepino**
- Cantidad de clones secuenciados		20	8	8
- Cantidad de variantes diferentes		12	6	4
- Longitud de las secuencias:	294nt	-	1 clon	-
	295nt	19 clones	4 clones	8 clones
	299nt	-	1 clon	-
	301nt	1 clon	-	-
	302nt	-	2 clones	-
- Fracción de clones que presentan la secuencia motivo cachexia (CVd-IIb)		19/20	5/8	8/8
- Fracción de cambios específicos[1]		99/100[a2]	29/40[b]	40/40[a]
- Secuencia motivo no cachexia (CVd-IIa) Cambios:[3]		5, 1clon (1/20)	1,2 y 3 – 1 clon (1/8) 1,2,3, 5 –2 clones (2/8)	0/8
- Fracción de cambios específicos[1]		1/100[a]	11/40[b]	0/40[a]

[1]Este parámetro tiene en cuenta la presencia individual de los cambios específicos de las secuencias motivos en el dominio variable que define el carácter de patogenicidad de las variantes del HSVd en cítricos. La totalidad de las posibilidades se tomó como el múltiplo entre cinco (número de cambios descritos) y el número total de clones secuenciados. [2]Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998) para $p<0.05$, el valor del error estándar es 0.018. [3]Los números de los cambios corresponden a los otorgados a los cinco nucleótidos diferentes identificados en el domino variable de las variantes del HSVd en cítricos como responsables de la inducción o no de la cachexia (ver tabla 3).

El alineamiento de las variantes del HSVd halladas en los tres hospedantes para el aislado PM 26-X, permitió detectar variaciones en los cinco dominios estructurales (tabla 12). Tomando como referencia la secuencia maestra en cidro (26x-c2), el menor número de variaciones se observó entre esta y las variantes provenientes de pepino; en este caso no se detectaron cambios en el dominio terminal derecho. Sin embargo, entre las poblaciones del HSVd obtenidas en cidro y lima el número de variaciones fue mayor. Conviene señalar que hubo un grupo de cambios que involucraron a los dominios patogénico, central y terminal derecho, que fueron comunes para dos variantes de lima (26x-l22m y 26x-l33) y una de cidro (26x-c33), siendo el patogénico el que presentó el mayor número de cambios.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de comparación de proporciones múltiples de las fracciones de cambios específicos de CVd-IIa y CVd-IIb presentes en cada población, reflejaron le existencia de diferencias significativas entre las poblaciones provenientes de cidro y pepino con respecto a lima. En este último se observó una secuencia (26x-l33) que fue idéntica a la secuencia maestra del aislado no patogénico CL 13-24 (cl-c3).

4.1.2. Predicción y análisis de estructuras secundarias

4.1.2.1. Análisis de estructuras secundarias predichas en variantes del HSVd de dos aislados de cítricos cubanos

La predicción de la estructura secundaria de mínima energía libre de las secuencias maestras, así como la del resto de las variantes del HSVd encontradas en las poblaciones estudiadas, propuso para la mayoría de ellas la conformación de estructura de varilla. No obstante, no fue estricta la conservación de las longitudes de los fragmentos de doble cadena ni la de los bucles formados. En el aislado patogénico PM 26-X se hallaron además, estructuras ramificadas en las poblaciones analizadas en los tres hospedantes de partida: en cidro dos variantes (26x-c10 y 26x-c26), una en lima (26x-l28) y una en pepino (26x-p44). Todas estas variantes contenían la secuencia motivo en el dominio variable descrita para las variantes del HSVd causantes de cachexia.

Resulta interesante que en el dominio patogénico se identificó una conformación que involucra un bucle de dos bases de uracilo (U) en la parte inferior de la estructura de varilla, que se mantuvo invariable para todas las secuencias analizadas, ya fuesen patogénicas o no (figura 11). Para la adopción de esta conformación en las secuencias de 294-295nt tiene lugar la aparición de co-variaciones o mutaciones compensatorias que ayudan a mantener una determinada estructura dentro de la molécula. En este caso consiste en la inserción de una base de guanina (G) en el nucleótido 47 en la cadena superior del dominio P, y de una base de citosina C en la posición 247 de la cadena inferior de este mismo dominio. Estas inserciones ocurren de manera co-variante en todos los casos hallados y cuando se elimina una de estas inserciones (*in silico*), la conformación de bucle de dos U se pierde.

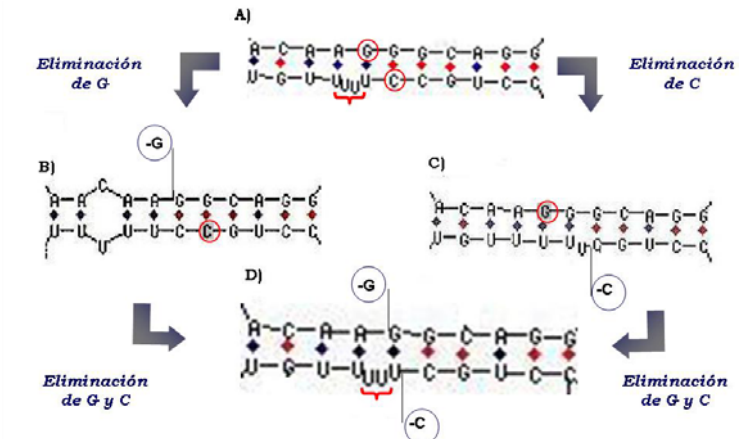


Figura 11. Fragmento de la estructura secundaria del dominio P del HSVd. **A:** Conformación adoptada por variantes de cítricos del aislado patogénico PM 26-X y del no patogénico Cl 13-24. Los nucleótidos circulados corresponden a las dos inserciones identificadas co-variantemente para el mantenimiento de la estructura de un bucle de dos U en las secuencias de 294 y 295 nt. **B y C:** Conformaciones adoptadas cuando aparece sólo una de las inserciones; en ambos casos desaparece el bucle de dos U. **D:** Una vez que se eliminan las dos inserciones se recupera la estructura secundaria inicial.

4.1.2.2. Identificación de grupos conformacionales por dominios en las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd informadas en base de datos

La predicción de las estructuras secundarias de mínima energía libre para las secuencias del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) evidenció la presencia de tres tipos fundamentales de conformaciones: la típica estructura de varilla (que adoptan la mayoría de las secuencias analizadas), tipo cruciforme (donde las ramificaciones involucran los dominios patogénico y central) y una tercera que se denominó ramificada (figura 12).

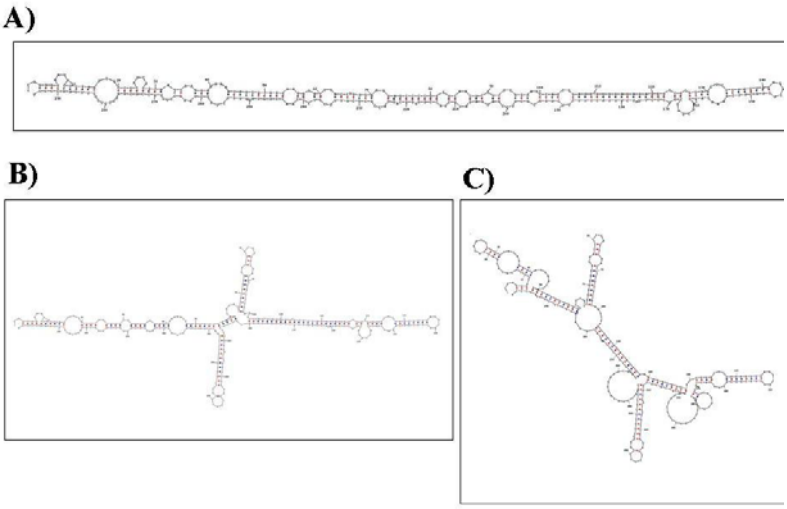


Figura12. Estructuras secundarias adoptadas por las variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003). **A):** varilla; **B):** cruciforme; **C):** ramificada. Las estructuras se obtuvieron mediante el programa MFOLD (Zuker, 2003).

La comparación de las estructuras secundarias en forma de varilla y cruciformes permitió identificar conformaciones específicas en cada uno de los dominios adoptadas por diferentes secuencias. Por esta razón estas conformaciones específicas se denominaron grupos conformacionales **(G_{cf})**. **Además, se detectaron otras conformaciones, representadas en su mayoría por sólo una secuencia, que en algunos casos mantuvieron cierta similitud con los grupos conformacionales.**

El análisis de la estructura secundaria en cada grupo conformacional permitió identificar dentro de ellos regiones en cuanto a la conformación adoptada, que condujo a una mejor comparación. Estas regiones se identificaron con letras en minúscula por orden alfabético y dentro de ellas conformaciones diferentes se designaron con números en orden ascendente. Cuando la diferencia de una región para diferentes G_{cf} involucró la inserción o deleción de un nucleótido en un bucle o de un par de nucleótidos en las zonas pareadas, se distinguieron con el símbolo de prima (´).

Para la denominación de los G_{cf} en cada dominio se utilizó la siguiente nomenclatura: X_{YN}

Donde: X, **representa la letra (s) que identifica a los dominios descritos en los viroides**

(T_L, P, C, V o T_R).

Y, **toma el valor de una letra en mayúsculas por orden alfabético que identifica a un grupo conformacional de otro para el mismo dominio.**

N, toma un valor numérico por orden ascendente y se especifica sólo cuando una conformación fue adoptada por un número de secuencias entre cinco y diez, y guardaba gran similitud con alguno de los $\mathbf{G_{cf}}$ identificados. En este caso se asume un subgrupo de dicha conformación.

Descripción de los $\mathbf{G_{cf}}$ *determinados para cada dominio*

Dominio Terminal Izquierdo (T_L)

Se identificaron tres conformaciones fundamentales (figura 13) que, al compararlas entre sí, permitió subdividir al dominio en dos regiones (a y b). La región **a** involucra a más del 50% de los nucleótidos y, como se observa, se mantuvo invariable para los tres $\mathbf{G_{cf}}$. Sin embargo, la región **b** mostró cierta variación, que en el caso de los grupos T_{LA} y T_{LB} sólo fue en un nucleótido que forma parte de un bucle, mientras que en el grupo T_{LC} la diferencia fue mayor. En este dominio se identificaron además 16 conformaciones poco representadas. De estas, al grupo T_{LA} se asociaron tres; al grupo T_{LB} sólo una que es adoptada por tres secuencias y cuya diferencia radicó en la región **b** del dominio.

De forma general, la región **a** mantuvo una estructura bastante conservada, aún en algunas de las conformaciones poco representadas y que no se asociaron a ninguno de los $\mathbf{G_{cf}}$ descritos. La misma involucró un bucle de cuatro nucleótidos en la cadena superior, un tallo de seis pares de bases seguido por un bucle de tres nucleótidos en la cadena superior y siete en la inferior, y un tallo de cuatro pares de bases.

Dominio Patogénico (P)

Se identificaron cuatro $\mathbf{G_{cf}}$ y tres regiones dentro del mismo (figura 14). La región **a** se mantuvo invariable para los cuatro grupos; la **b** mostró la misma conformación en los grupos P_B y P_C, mientras que en P_A la diferencia fue de sólo un par de bases que provocó el alargamiento del tallo, y en el caso del grupo P_D se mantuvo la presencia del par de bases descrita en P_A y además, el bucle de dos uracilos en la cadena inferior involucró una base en la cadena superior. La conformación de la región **c** fue la misma para los grupos P_C y P_D, mientras que en el resto de los grupos las diferencias fueron mayores. En los cuatro grupos se mantuvo el bucle final que involucró dos nucleótidos de la cadena superior y dos de la inferior. Además, el bucle de dos uracilos in formado en este dominio, identificado y descrito en el acápite 4.1.2.1, estuvo presente en todos los $\mathbf{G_{cf}}$, así como en la mayoría de las conformaciones asociadas a ellos. Igualmente, se presentaron las co-variaciones asociadas al mantenimiento de este bucle.

Además de los **G_{cf}** descritos, se identificaron en este dominio 24 conformaciones poco representadas. De estas, al grupo **P_A** se asociaron tres conformaciones; al **P_B** seis, al P_C cuatro, mientras qua a **P_D** se asociaron cinco.

Dominio Central (C)

Se determinó la existencia de tres **G_{cf}** y se subdividió en dos regiones (figura 15). La región **a** involucró a la mayor parte del dominio y mostró la misma conformación en los grupos **C_A** y **C_B**, mientras que en el grupo **C_C** las diferencias estuvieron dadas por un nucleótido en la cadena inferior que se incorporó a un bucle y uno en la cadena superior incorporado a otro bucle, así como un par de bases adicionadas al final de esta región. A pesar de estas tres diferencias, no se observó un cambio drástico en la conformación de esta región. Por su parte, la región **b** se presentó de manera diferente en cada uno de los **G_{cf}**, aunque mantuvieron en común el tallo final de cuatro pares de base. Los grupos **C_B** y **C_C** mostraron una región mayor de homología.

Para este dominio se encontraron sólo siete conformaciones poco representadas y, en todos los casos, fue posible asociarlas a los grupos descritos previamente. Al grupo **C_A** se asignaron tres conformaciones, el mismo número para **C_B** y sólo una al **C_C**.

En el caso de las estructuras cruciformes que involucran los dominios patogénico y central (figura 15B), se observaron cuatro conformaciones de las cuales sólo una pudo definirse como un grupo conformacional, mientras que las tres restantes estuvieron representadas por sólo una secuencia (figura 16). Básicamente, estas conformaciones se caracterizaron por presentar una ramificación en la cadena superior y una en la inferior.

Dominio Variable (V)

Se identificaron cinco **G_{cf}**, que quedaron subdivididos en dos regiones para cuatro de estos grupos (V_A, V_B, V_C y V_D), mientras que para el grupo V_E sólo se definió una única región (figura 17). La región **a** estuvo presente en todos los grupos y abarcó poco menos del 90% de los nucleótidos de este dominio para los grupos que se subdividieron en las dos regiones. Las diferencias observadas en ellas para cada uno de los grupos no conllevaron cambios drásticos en su conformación, pues estas giraron alrededor de una combinación de tallos y bucles con pequeñas variaciones. La región **b** involucró a un grupo pequeño de nucleótidos y la única diferencia entre los grupos identificados radicó en el número de nucleótidos de la cadena superior involucrados en el bucle final de dicha región. Como se mencionó anteriormente, esta región no se observó en el grupo **V_E.**

En este dominio se identificaron además, 10 conformaciones poco representadas. De ellas, se asociaron dos a los grupos **V_A** y **V_D** (una a cada una), mientras que al grupo **V_C** se asociaron dos conformaciones de las cuales una agrupó a siete secuencias, razón por la que se definió como un subgrupo dentro del grupo **V_C**. Igualmente al grupo **V_E** se asoció un subgrupo conformado por siete secuencias.

Dominio Terminal Derecho (T_R)

En este dominio se identificaron tres **G_{cf}** (figura 18). Las diferencias entre ellos abarcaron todo el dominio y en este caso no se subdividió en regiones. Entre las características más distintivas de estos grupos se observó que en T_{RA} se mantuvo una estructura en forma de varilla interrumpida por cuatro bucles, y en T_{RB} también se presentó una estructura en forma de varilla con la peculiaridad de que uno de los bucles involucró a seis nucleótidos de la cadena inferior y sólo uno de la superior, lo cual le confirió una conformación característica. Por otra parte, el grupo T_{RC} estuvo caracterizado por presentar una bifurcación hacia la derecha del dominio, que abarcó a la mayoría de los nucleótidos del mismo, a partir de un bucle inicial.

Se identificaron también siete conformaciones poco representadas. De ellas se asoció al grupo T_{RA} una conformación que involucraba a diez secuencias, por lo que se definió como un subgrupo dentro de este grupo. A los grupos T_{RB} y T_{RC} se asociaron cuatro y dos, respectivamente, de las conformaciones poco representadas.

Conformaciones Ramificadas

Cuando se hizo el análisis de las seis conformaciones ramificadas obtenidas, se observó que estas presentaron diferencias entre sí y que, de manera general, se pudo identificar una zona hacia el centro de la estructura que presentó un apareamiento sin ramificaciones (figura 12C). En dos de las secuencias estudiadas esta región fue idéntica, y en ella estaban involucradas nucleótidos de cuatro dominios (según el modelo de dominios funcionales). El resto de las conformaciones guardó cierta similitud con esta estructura a excepción de una de las secuencias. Esta zona central estuvo flanqueada por dos regiones ramificadas que no conservan gran similitud entre cada una de las conformaciones.

Una vez identificados los **G_{cf}** en cada dominio primeramente se realizó un análisis con las variantes del HSVd informadas en cítricos, enfocado según la clasificación de las variantes en cuanto a la presencia de la secuencia motivo característica de CVd-IIa, CVd-IIb y variantes intermedias, para establecer posibles relaciones entre la adopción de determinados **G_{cf}** por dominios y el comportamiento biológico de las variantes. La tabla 13 presenta las proporciones de variantes para las tres clases analizadas que adoptaron las conformaciones que se presentaron en el hospedante cítrico, y la tabla 14 refleja los resultados obtenidos a partir de la aplicación de la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft,* 1998).

Como muestran las tablas 13 y 14, en el dominio terminal izquierdo no hubo diferencias significativas entre los tres tipos de variantes del HSVd analizadas para la adopción de una conformación determinada. Tomando como criterio de homogeneidad el número de **G_{cf}** descritos, tanto este dominio como el central fueron los más conservados, no obstante, en este último se observó una tendencia de las variantes tipo CVd-IIa e intermedias por adoptar la conformación C_A, y de las variantes tipo CVd-IIb por adoptar la

conformación C_B.

En el dominio patogénico aunque no fue evidente la diferenciación entre los tres tipos de variantes analizadas y la adopción de **G_{cf}**, se pudo apreciar determinadas tendencias para cada uno de ellos. Es de destacar que la conformación P_A sólo fue adoptada por variantes CVd-IIb. En este dominio aparece un subgrupo asociado a la conformación P_B, denominado P_{B1} (figura 14), que sólo fue adoptado por variantes CVd-IIa e intermedias y cuya única diferencia respecto a P_B fue en un nucleótido involucrado en la formación de un bucle.

En el dominio variable se observó diferencias en la adopción de los **G_{cf}** por cada tipo de variante del HSVd. Las variantes tipo CVd-IIa y CVd-IIb adoptaron dos **G_{cf}** cada una, y en ningún caso se observó la adopción de la misma conformación. Para las variantes intermedias hubo una conformación diferente que sólo fue adoptada por una variante tipo CVd-IIa. Las diferencias encontradas entre las conformaciones V_A y V_B adoptadas por las variantes CVd-IIb (figura 17), no interfirieron en la formación de un brazo de 7 pb descrito como característico de las variantes causantes de cachexia (Palacio-Bielsa *et al.*, 2004), y en su formación están involucrados los cambios descritos en la secuencia motivo del dominio variable que discrimina a las variantes CVd-IIa y CVd-IIb. En el caso de las conformaciones V_C y V_D, adoptadas por variantes tipo CVd-IIa, las diferencias encontradas entre ellas involucraron un brazo que en el caso de V_C fue de 7pb y en V_D de 8pb. La conformación V_E adoptada por las variantes intermedias, algunas de las cuales se obtuvieron a partir de aislados no causantes de cachexia, tampoco conservó el brazo de 8 pb descrito para las variantes no patogénicas.

En el dominio terminal derecho las variantes CVd-IIa adoptaron mayoritariamente la conformación T_{RA}, mientras que las variantes tipo CVd-IIb adoptaron los grupos conformacionales T_{RA} y T_{RB}, y además en ellas se identificó un subgrupo denominado T_{RA1} cuya única diferencia con el grupo T_{RA} estuvo dada por un nucleótido involucrado en la formación del bucle final. En el caso de las variantes intermedias estas adoptaron mayormente la conformación T_{RB}.

Para determinar los cambios específicos de nucleótidos que estaban involucrados en la formación de los **G_{cf}** se realizaron ensayos *in silico* en los cuales se modificaron las secuencias de variantes que mostraron diferencias entre sí, ya fuese en la secuencia de bases o en la estructura secundaria. Esto permitió observar que hubo variantes donde se presentaron cambios en varios dominios estructurales que, sin embargo, no implicaron un cambio en la topología de la estructura secundaria, mientras que en otros casos una sola variación fue capaz de inducir cambios más drásticos en la estructura. Ejemplo de esto se muestran en las figuras 19 y 20.

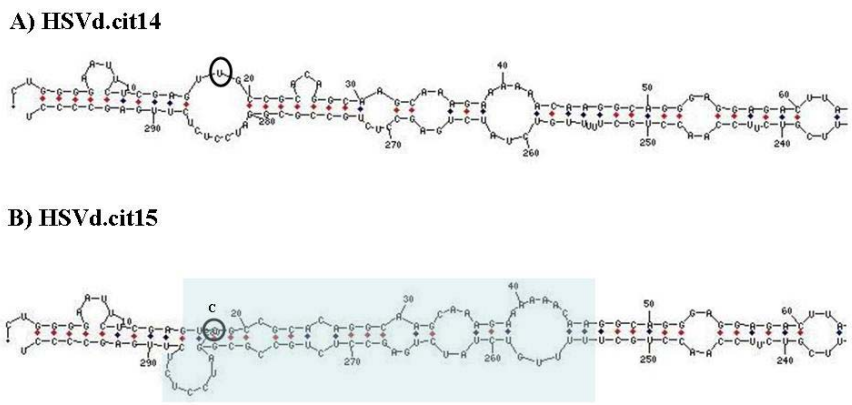


Figura 19.Fragmentos de las estructuras secundarias de mínima energía libre de los dominios TL y P, obtenidas mediante el programa MFOLD. **A)** variante HSVd.cit14; **B)** variante HSVd.cit15. Se circula el nucleótido que difirió entre ambas variantes. Se sombrea la zona que varió en la estructura secundaria.

La figura 19 muestra la comparación de las estructuras secundarias entre dos variantes cuya diferencia en la secuencia radicó en el cambio de una base U por una C en el nucleótido 18 (perteneciente a la hebra superior del dominio T_L). En la variante HSVd.cit14 (A) la U estaba formando parte de un bucle superior y al ser sustituido por la C (HSVd.cit15), provocó que esta formara un apareamiento G:C y que tuviera lugar un reordenamiento en los dominios T_L y P (B). En este caso los valores de energía libre de ambas conformaciones fueron similares (-118.4 y -119.1 kcal/mol, respectivamente).

En la figura 20A se muestra que aunque la variante HSVd.cit16 presentó cuatro cambios de nucleótidos en su secuencia con respecto a la variante HSVd.cit19 que involucraron a los dominios terminal izquierdo y patogénico, se predijo la misma estructura secundaria para toda la molécula en ambos casos. Esto pudo deberse a que los cuatro cambios estaban involucrados en la formación de bucles en ambas variantes. Sin embargo, en el caso de la variante HSVd.cit18 (B), que sólo presentó un cambio en el nucleótido 46 (hebra superior del dominio P) en relación a HSVd.cit16, la estructura secundaria de los dos dominios resultó diferente. El nucleótido de adenina (A) en la variante HSVd.cit16 estaba formando parte de un brazo donde se encontraba apareado con una base de uracilo (U), que al cambiar por guanina (G) en la variante HSVd.cit18 continuó apareada con U formando una unión tipo *Wooble* G:U. Aunque cabría esperar que al mantenerse este apareamiento no debía cambiar la estructura secundaria, sin embargo en esta última variante ocurrió una reorganización que abarcó parte de los dominios terminal izquierdo y patogénico. Cuando se compararon los valores de energía libre (dG) de las tres variantes analizadas se observó que para HSVd.cit16 y HSVd.cit19 estos valores difirieron en menos de una unidad (-115.2 y -116.0 kcal/mol, respectivamente), mientras que para HSVd.cit18 fue de -111.1 kcal/mol, lo cual denota una menor estabilidad de la molécula.

Además de las estructuras de varillas en las variantes cítricas del HSVd se observaron seis secuencias que adoptaron diferentes conformaciones ramificadas que involucraron toda la molécula y en las cuales no fue posible ubicar los dominios estructurales definidos. De estas secuencias, cinco correspondieron a variantes tipo CVd-IIb y una a una variante intermedia. En el caso de las variantes tipo CVd-IIb cuatro fueron secuencias obtenidas en este trabajo a partir del aislado patogénico PM 26-X en los tres hospedantes analizados. En cidro fueron las variantes 26x-c10 y 26x-c26; en lima, 26x-l28 y en pepino 26x-p44. Cuando se compararon las estructuras de estas cuatro variantes se observó que fueron

diferentes, no obstante, se pudieron identificar básicamente tres regiones (figura 21), dentro de las cuales 1 y 2 fueron las más conservadas.

La **región 3** fue la de mayor variación en cuanto a la conformación adoptada, pues en ninguna de las variantes se repitió la conformación de la región. En la figura 21 se ilustra la adoptada por la variante 26x-l28 y se señala el brazo 1 que fue común con la variante 26x-p44. Esta región involucró a los nucleótidos de las posiciones 130-275, en los que se observaron variaciones entre las secuencias de las cuatro variantes estudiadas. Con excepción de la variante 26x-c26, donde hubo cuatro posiciones de nucleótidos con variaciones, el resto varió en sólo un nucleótido.

El análisis de estas variantes ramificadas para el aislado PM 26-X permitió establecer comparaciones de sus secuencias con las de las variantes maestras de la población de la cual provenían. Los alineamientos evidenciaron que en el caso de 26x-c10 la única variación con la secuencia maestra de esta población fue en el dominio terminal derecho (cambio de A hacia G en el nucleótido 167), mientras que para 26x-c26 hubo variaciones en cinco posiciones que involucraron a tres dominios (tabla 12). Por su parte las variantes de lima y pepino tuvieron variaciones en dos nucleótidos con respecto a sus respectivas secuencias maestras.

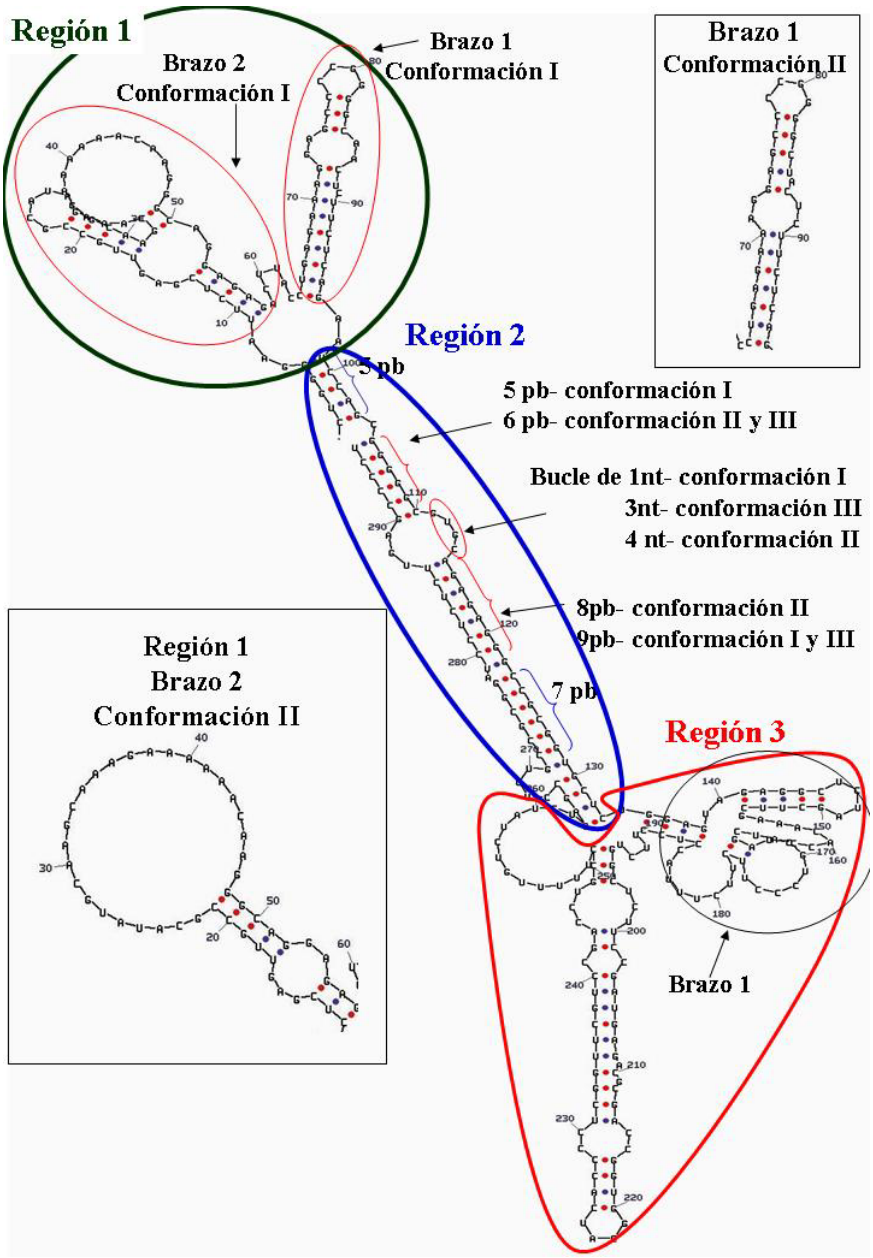


Figura 21. Conformación de la estructura secundaria de algunas variantes del HSVd en la que se involucran varios dominios en ramificaciones.

Después de analizar las peculiaridades en la adopción de las conformaciones por dominio en el caso de las variantes del HSVd informadas en cítricos, se procedió a determinar cómo se presentaban las conformaciones en las variantes del HSVd informadas en la base de datos, teniendo en cuenta el hospedante del cual procedían. En la tabla 15 se recogen las proporciones de la adopción de estos $\mathbf{G_{cf}}$ por variantes de secuencia.

El análisis de conglomerados a partir de las proporciones de variantes del HSVd que adoptaron una conformación determinada para cada dominio, permitió agrupar a las variantes según el hospedante de origen (figura 22).

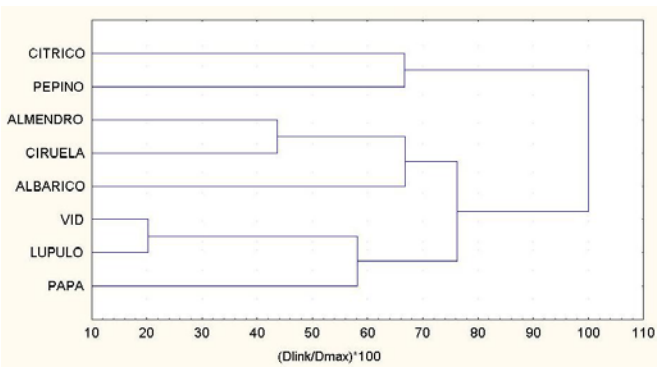


Figura 22. Diagrama de árbol obtenido por el análisis de conglomerados mediante el modelo UPGMA a partir de las proporciones de adopción de grupos conformacionales por dominios estructurales en la estructura secundaria de mínima energía libre,

de variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) en diferentes hospedantes.

Según muestra la figura 22, la mayor disimilaridad (asumida como el 100%) estuvo dada entre dos grupos en los que las variantes del HSVd de los hospedantes cítrico y pepino formaron uno y el otro agrupó a las provenientes del resto de los hospedantes. En el primer grupo las variantes de cítrico y pepino mostraron aproximadamente un 66% de disimilaridad, mientras que en el segundo grupo las variantes de los diferentes hospedantes mostraron variados grados de disimilaridad.

De esta manera, hubo un agrupamiento de las variantes provenientes de hospedantes del género *Prunus* sp. (almendro, ciruelo y albaricoquero), los cuales mostraron un 76% de disimilaridad respecto a las variantes provenientes de los hospedantes vid, lúpulo y papa. Dentro de las especies del género *Prunus* las variantes de almendro y ciruelo fueron las que mostraron una menor disimilaridad entre ellas. Por su parte las variantes provenientes de vid y lúpulo fueron las que mostraron la menor disimilaridad entre todos los hospedantes (20%).

La comparación de las proporciones múltiples de variantes del HSVd que adoptaron una conformación por dominio, reflejaron una tendencia hacia la adopción de determinado grupo conformacional según el hospedante en la mayoría de los dominios, a excepción del dominio terminal izquierdo en el cual para la mayor parte de las variantes se predijo la adopción conformaciones $T_{L\mathbf{A}}$ y $T_{L\mathbf{B}}$ sin establecerse una clara diferenciación entre ellas. Los dominios patogénico y variable fueron los que mayor información brindaron sobre la diferenciación de los $\mathbf{G_{cf}}$ según el hospedante de origen (tabla 16).

Para el análisis se tuvo en cuenta no sólo la tendencia hacia la adopción de un determinado grupo, sino además la ausencia de un grupo específico. De esta manera, la comparación del comportamiento observado en el dominio patogénico permitió definir una primera división en tres grupos fundamentales: los que no adoptaron la conformación P_A (variantes provenientes de albaricoquero, ciruelo y almendro); los que no adoptaron la conformación P_D (variantes provenientes de cítricos y pepino) y los que no adoptaron las conformaciones P_A y P_D (variantes provenientes de vid, lúpulo y papa).

Dentro de las variantes que no adoptaron la conformación P_A aquellas que provenían de albaricoquero y ciruelo tuvieron como peculiaridad que se subdividieron en dos grupos, uno de los cuales enmarcó a un número pequeño de secuencias que mostraron una estructura cruciforme, y el otro mostró una tendencia hacia la adopción de la conformación P_D. Adicionalmente a este grupo inicial se asociaron las variantes de almendro, cuyas conformaciones en este dominio estuvieron asociadas a P_D. Ninguna de estas variantes adoptó la conformación P_B.

Las variantes del HSVd provenientes de cítrico y pepino, las cuales no adoptaron la conformación P_D,

mostraron como característica común la adopción de la conformación $P_{B.}$ De hecho, las dos variantes de pepino la mostraron y las variantes de cítrico tendieron a ella, conjuntamente con la conformación P_A. En el caso de las variantes que no adoptaron las conformaciones P_A y P_D, quedaron agrupadas las provenientes de los hospedantes vid y lúpulo, las cuales mostraron una tendencia hacia la adopción de P_C. La variante proveniente de papa inicialmente se asoció a este grupo pues la conformación que adoptó tuvo similitud con P_C.

Por su parte, el análisis de la adopción de los $\mathbf{G_{cf}}$ de estructura secundaria en el dominio variable permitió establecer una diferenciación entre algunas de las variantes del HSVd a partir de hospedantes diferentes, que según el dominio patogénico pertenecían al mismo grupo. En el caso del subgrupo que incluía a las variantes de ciruelo y albaricoquero, que tendían a adoptar la conformación P_D, se observó que las secuencias provenientes de ciruelo mantuvieron una fuerte tendencia hacia la adopción de la conformación V_G. De igual manera, tal conformación fue adoptada por las variantes que mostraron la estructura cruciforme que involucraba a los dominios patogénico y central. Sin embargo, en las variantes de albaricoquero se observó una mayor heterogeneidad en la conformación del dominio variable. De hecho, no se observó una tendencia hacia la adopción de una conformación específica e incluso, la conformación más representada no correspondió a ninguno de los $\mathbf{G_{cf}}$ descritos.

Además, el grupo que según el análisis de la estructura secundaria del dominio patogénico incluía a las variantes de cítrico y pepino, mostró diferencias en el dominio variable según el hospedante de origen. En este caso las variantes de cítrico mostraron una tendencia hacia la adopción de las conformaciones V_A, V_B y V_C, las cuales estuvieron relacionadas con la secuencia motivo que define a las variantes causantes o no de cachexia. Una de las dos secuencias del HSVd proveniente de pepino adoptó una conformación que fue adoptada por sólo algunas secuencias intermedias de cítrico. Resulta interesante señalar que ninguna variante del HSVd que no proviniese de cítricos adoptó alguna de las dos conformaciones en el dominio variable descritas para las variantes patogénicas en cítricos, lo que pudiera representar una evidencia de selección por parte del hospedante sobre este dominio.

En el caso de las variantes provenientes de vid y lúpulo el análisis de la adopción de $\mathbf{G_{cf}}$ de estructura secundaria en el dominio variable no mostró una diferenciación entre ellas ya que en ambos hospedantes tendieron a adoptar la conformación $V_{E,}$ que también fue adoptada por la variante proveniente de papa.

A partir del análisis realizado en la adopción de determinados $\mathbf{G_{cf}}$ en la estructura secundaria de los dominios patogénico y variable para las variantes del HSVd informadas en diferentes hospedantes, se pudo definir la existencia de diferentes grupos (figura 23). En primer lugar, a nivel del dominio patogénico, se establecieron cuatro grupos iniciales que incluyeron a más de un hospedante cada uno, y en los que las variantes provenientes de almendro y papa se asociaron a dos de ellos. Posteriormente, a nivel de la conformación adoptada por el dominio variable, fue posible establecer diferencias entre

algunas variantes que se habían agrupado conjuntamente.

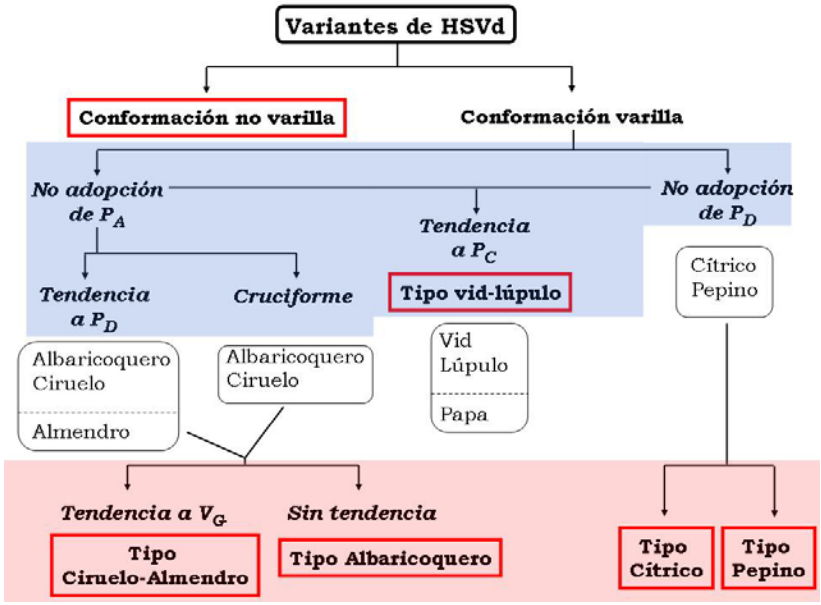


Figura 23. Agrupamiento de las variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003), según la adopción de grupos conformacionales por dominio. La zona sombreada en azul indica la división alcanzada a nivel del dominio patogénico (P) y en rojo a nivel del dominio variable (V). Las letras subíndices se refieren a los grupos conformacionales descritos. Las líneas discontinuas señalan que las variantes provenientes de los hospedantes almendro y papa adoptan conformaciones asociadas a las indicadas. Se enmarcan en rojo los grupos definidos.

4.2. Relación entre cambios en la molécula del HSVd y la replicación y movimiento del viroide en plantas de pepino

Selección de variantes

A partir de los resultados obtenidos en la caracterización molecular del aislado causante de cachexia PM 26-X, se seleccionó la variante 26x-c2, correspondiente a la secuencia maestra del HSVd de la población analizada en cidro y otras tres variantes que diferían en sus secuencias y estructuras secundarias de mínima energía libre (figura 24). En la mayor parte de los dominios, excepto el terminal izquierdo, al menos una variante mostró diferencias respecto a la secuencia maestra. Para hacer referencia a las conformaciones adoptadas en cada dominio se tomó como base lo analizado en el acápite 4.1.2.2.

En el **dominio patogénico** dos variantes presentaron diferencias en cuanto a la estructura secundaria y en ambos casos las conformaciones adoptadas no se correspondieron con ninguno de los G_{cf} identificados previamente. En el caso de la variante **26x-c33**, están involucrados los siguientes cambios de la secuencia de esta variante: nt 50: aparece C en lugar de G; nt 51: A en lugar de C; nt 52: G en lugar de C; nt 247: U en lugar de G; nt 251: A en lugar de G y la deleción de una C en el nt 258. En la variante **26x-c45**, el único cambio de nucleótido involucrado en este dominio se corresponde con la sustitución de una A por una G en la posición 32. Esta fue la única diferencia identificada en la variante 26x-c45 con respecto a la 26x-c2.

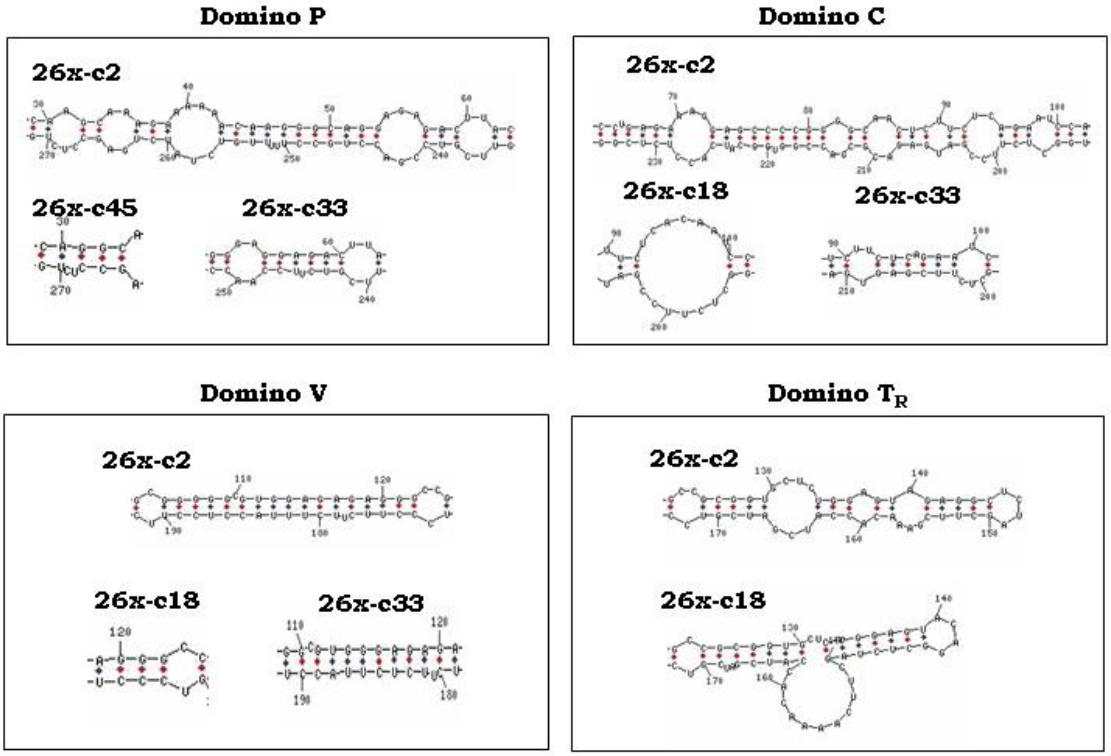


Figura 24: Fragmentos de variación en la estructura secundaria de las variantes del HSVd inoculadas en plantas de pepino, con respecto a la secuencia maestra 26x-c2**.**

El **dominio central**, a pesar de ser uno de los dominios donde se detectaron cambios mínimos en la secuencia de nucleótidos, presentó diferencias en la estructura secundaria de dos de las variantes seleccionadas. En la variante **26x-c18** la conformación adoptada no estuvo incluida en ninguno de los grupos descritos; la única diferencia en la secuencia nucleotídica identificada en el dominio C de la variante 26x-c18, con respecto a la variante maestra, fue la inserción de una G en la posición 98. Por su parte, la variante **26x-c33** adoptó una de las conformaciones descritas y los cambios de nucleótidos que aparecen en este dominio respecto a la variante maestra son los siguientes: nt 208: aparece G en lugar de C; nt 209: A en lugar de G; nt 210: G en lugar de A; nt 242: inserción de U; nt 243: inserción de C y nt 244: inserción de G.

En el **dominio variable**, se identificaron diferencias en la estructura secundaria de las variantes 26x-c18 y 26x-c33. En **26x-c18** se presentó el grupo conformacaional V_B identificado en variantes patogénicas. Las posiciones de los nucleótidos que están comprendidos en este cambio (122-124 de la cadena superior y 190-192 de la inferior), aunque pertenecen al dominio variable, se encuentran en la frontera con el terminal derecho, lo que hace difícil su ubicación exacta en uno de ellos. La pertenencia de los nucleótidos a uno u otro dominio específico, está determinado por evidencias experimentales con un grupo de especies de viroides y variantes de estos, pero no constituye una esquematización rígida en cuanto a sus límites (Palacio-Bielsa 1999). En este dominio no se encontraron diferencias en la secuencia nucleotídica del 26x-c18 con respecto al 26x-c2, por lo que, en todo caso, este reordenamiento es debido a cambios en la secuencia de otros dominios que tienen una implicación directa sobre la estructura secundaria de mínima energía libre de toda la molécula.

La variante **26x-c33** no adoptó una conformación que correspondiese con alguno de los grupos

descritos previamente. Los cambios identificados en la secuencia de esta variante, dentro del dominio mencionado fueron: nt 116: inserción de una G; nt 187: inserción de C; nt 194: aparece U en lugar de C y nt 197: C en lugar de U.

En el **dominio terminal derecho**, solamente la variante **26x-c18** mostró diferencias respecto a la secuencia maestra. En este caso se adoptó una conformación no clasificada en los $\mathbf{G_{cf}}$ identificados. Como se observa, la única parte común entre la variante 26x-c18 y el resto, incluyendo la secuencia maestra, consiste en el anillo de cuatro bases que se forma en el extremo de la molécula, que aquí se presenta con un corrimiento de nucleótidos.

Es interesante destacar que las diferencias en cuanto a la secuencia nucleotídica dentro de este dominio para la variante 26x-c18, sólo involucró a dos bases, una en la posición 145, que en este caso fue de una C en lugar de una G y otra en la 160, donde aparece una A en lugar de una G. Sin embargo, en la variante 26x-c33 se detectaron igualmente dos diferencias con respecto a la secuencia maestra, las cuales consistieron en: nt 151: inserción de U y en el nt 154: aparece U en lugar de A, que apenas tuvieron implicación alguna sobre la estructura de este dominio. En este caso la conformación adoptada en el extremo derecho fue de un anillo de cinco bases desapareadas.

Las diferencias en la estructura secundaria entre las variantes de secuencias seleccionadas pueden computarse de la siguiente manera:

- **Variante 26x-c2** corresponde con la secuencia maestra.
- **Variante 26x-c45** sólo difiere en el **dominio P**.
- **Variante 26x-c33** difiere en los dominios **P, C y V**.
- **Variante 26x-c18** presenta diferencias en los **dominios C, V y $\mathbf{T_R}$**.

En todos los casos las diferencias mostradas fueron exclusivas para cada variante.

- Evaluación de la replicación y movimiento a larga distancia en plantas de pepino

En los extractos de ácidos nucleicos de las plantas analizadas se detectó la presencia del HSVd mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Las evaluaciones realizadas durante la primera semana posinoculación revelaron que sólo las variantes 26x-c2 y 26x-c18 fueron capaces de replicarse y moverse dentro de la planta a niveles detectables por el método utilizado. En la figura 25 se muestran los valores de densidad óptica obtenidos en los diferentes tiempos donde los resultados indican que desde las dos horas posteriores a la aplicación del inóculo tuvo lugar la replicación en las plantas. La misma se incrementó de manera gradual en ambas variantes sin observarse diferencias significativas ($p<0.05$) entre ellas según lo obtenido de la comparación de análisis de varianza no paramétrica por el método de Kruskal-Wallis (SAS, 2001) donde el valor de H para cada comparación estuvo en el rango de 0.16 a 2.40. En estas dos variantes, a pesar de que mostraron variaciones en cuatro dominios (central, variable y terminal derecho) no se observaron diferencias en la capacidad de replicarse y/o moverse en el hospedante, a

excepción de la parte de la planta donde se detectaron a las dos horas (26x-c2, en cotiledones y primera hoja verdadera; 26x-c18, en cotiledones).

Las evaluaciones de las plantas inoculadas a los 17 días posinoculación, mostraron que las cuatro variantes analizadas se replicaron a niveles detectables por la hibridación de ácidos nucleicos (datos no mostrados). Sin embargo, no se observaron síntomas en las plantas inoculadas con respecto al control no inoculado durante los 25 días que se mantuvieron en las casas de malla.

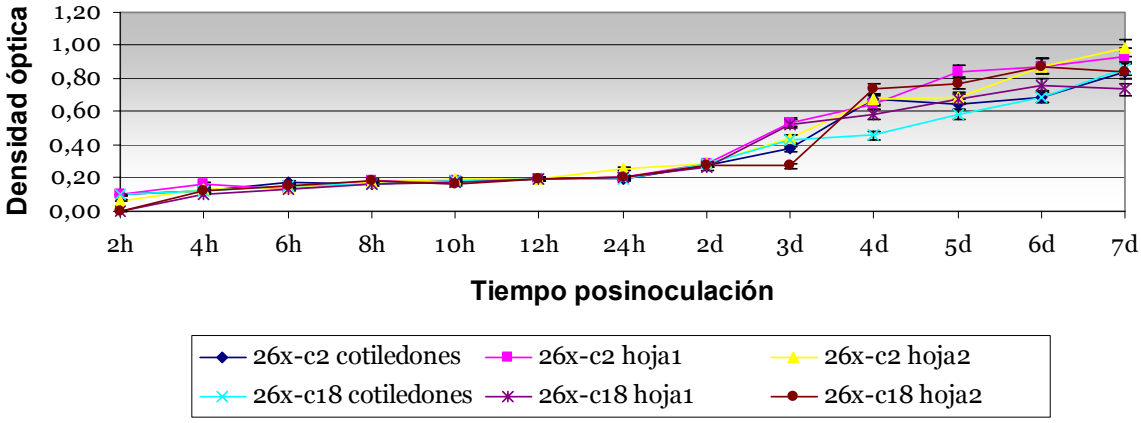


Figura 25. Valores medios de densidad óptica de las señales de NASH en la detección del HSVd en plantas de pepino a diferentes tiempos posinoculación con las variantes 26x-c2 y 26x-c18.

4.3. Detección diferencial y diagnóstico de variantes cítricas del HSVd

4.3.1. Diferenciación de variantes patogénicas o no mediante RT-PCR

La tabla 17 muestra los parámetros de eficiencia determinados según el programa Oligo para los cebadores homólogos a las secuencias motivo que definen el carácter de patogenicidad del HSVd en cítricos (Palacio-Bielsa, 1999) diseñados en este trabajo, **IIa** y **IIb**, así como su relación con el cebador complementario Vp19 (Astruc *et al.*, 1996).

Tabla 17. Parámetros de eficiencia, obtenidos por el programa Oligo (versión 6.31, Wojciech y Piotr Rychlik, 1989-2000), para los cebadores utilizados en la diferenciación de variantes del HSVd de cítricos.

	Cebador		
Parámetros	**Homólogo IIa**	**Homólogo IIb**	**Complementario Vp19**
Especificidad	No se detectaron sitios de falso apareamiento	No se detectaron sitios de falso apareamiento	No se detectaron sitios de falso apareamiento
Formación de estructuras *hairpin* (gancho de pelo)	Se puede formar una zona de apareamiento de sólo 3 pb (dG=-1.0 kcal/mol)	No	Puede adoptar tres conformaciones que involucran una zona de apareamiento de 3 pb (dG= -1.7-0.6 kcal/mol)
Formación de dímeros en el extremo 3´ con el cebador pareja	No	No	No

El análisis de los parámetros de eficiencia predijo que para los dos cebadores homólogos diseñados, **IIa** y **IIb**, no se encontraron sitios de falso apareamiento e incluso, este parámetro se comportó de forma similar para el cebador Vp19 lo cual indica una alta especificidad de los mismos por el sitio de apareamiento.

En el cebador homólogo **IIa** y el complementario Vp19 se predijo la capacidad de plegarse sobre sí y formar estructuras de *hairpin*, que no involucraron la formación de fragmentos de más de tres pares de bases y que, además, tuvieron valores de energía libre relativamente altos (-1.7 a 0.6 kcal/mol). Esto indica que la adopción de dichas estructuras no es estable y existe por tanto muy baja tendencia a formarla. En el cebador **IIb** no se predijo la formación de tales estructuras de *hairpin*. Los cebadores que forman estas estructuras o dímeros son particularmente inapropiados cuando involucran el extremo 3´ terminal, ya que esto puede causar una extensión interna del cebador que lo elimina de la reacción (Rychlik *et al*., 1995).

Los resultados obtenidos en los parámetros determinados para cada uno de los cebadores predijeron una adecuada eficiencia de estos y para ninguna de las dos parejas se infirió la formación de dímeros por complementariedad entre ellos.
Una vez determinados los parámetros de eficiencia de los cebadores, se procedió a realizar la RT-PCR a partir de los aislados causantes de cachexia, y de PCR a partir de los clones específicos de las variantes CVd-IIa y CVd-IIb, cuyos resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Detección diferenciada de variantes de CVd-IIa y CVd-IIb mediante PCR.

Pareja de cebadores	**Condiciones de hibridación**					
	a) 60s a 60°C		**b)** 40s a 70°C		**c)** 20s a 70°C	
	CVd-IIa	CVd-IIb	CVd-IIa	CVd-IIb	CVd-IIa	CVd-IIb
Vp19-IIa	+++*	-	-	-	-	-
Vp19-IIb	+++	+++	+	+++	-	+++

* **+++**: Banda de alta intensidad; **+**: Banda de baja intensidad; **-**: No detección de banda. En todos los casos la intensidad de las bandas de ADN fue estimada de manera cualitativa por comparación entre ellas.

Como se puede observar, cuando se realizó la hibridación molde-cebador durante 60s a 60°C (poco restrictivo), la pareja de cebadores Vp19-IIa amplificó solamente a las variantes CVd-IIa, lo cual denota una adecuada especificidad para la detección de las mismas bajo las condiciones ensayadas. Sin embargo, en estas mismas condiciones, la pareja de cebadores Vp19-IIb fue capaz de amplificar ambos tipos de variantes, por lo que no resultó específica.

Al hacer más restrictivas las condiciones de la hibridación molde-cebador mediante un incremento de la temperatura a 70°C, 10°C más que en la condición inicial, la pareja de cebadores Vp19-IIa no amplificó a las variantes de CVd-IIa, mientras que la pareja Vp19-IIb continuó amplificando a CVd-IIb con una alta intensidad en las bandas obtenidas, y mantuvo además, la amplificación de CVd-IIa, aunque en este caso se observó una menor intensidad en las bandas al ser teñidas con bromuro de etidio (figura 26A). Tal inespecificidad se eliminó al reducir el tiempo de hibridación a 20 segundos (la mitad de las

condiciones iniciales), y manteniendo la temperatura a 70°C. Estas nuevas condiciones no tuvieron una implicación negativa en la amplificación de las variantes de CVd-IIb (figura 26B).

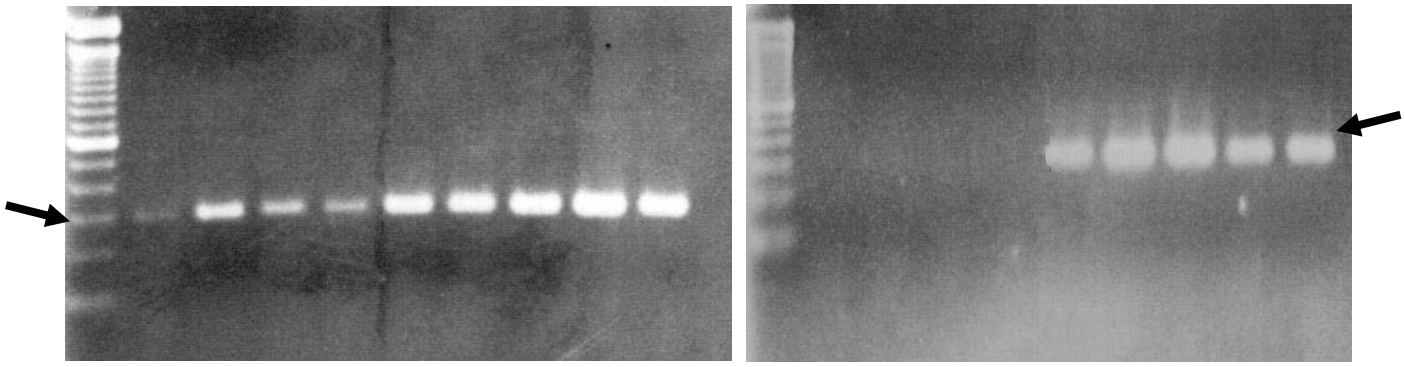


Figura 26. Productos de PCR obtenidos al analizar las variantes CVd-IIa y CVd-IIb con la pareja de cebadores Vp19-IIb, a temperatura de hibridación de 70°C y diferentes tiempos de duración: A) 40 segundos; B) 20 segundos. Carril 1: Marcador de peso molecular de 100 pb (Gibco); carriles 2-5: clones de CVd-IIa; carriles 6-10: clones de CVd-IIb. Las flechas indican la banda de 300 pb correspondiente a la secuencia esperada del HSVd.

Con los resultados obtenidos quedaron definidas las condiciones de hibridación molde-cebador de la PCR para la discriminación de las variantes CVd-IIa y CVd-IIb: para la pareja de cebadores Vp19-IIa fue de 60s 60°C y para Vp19-IIb fue de 20s a 70°C.

Uno de los factores más importantes que afectan la calidad de la PCR es la selección del cebador y de las condiciones que puedan incidir sobre la estabilidad del híbrido que forma este con el ADN molde durante la hibridación (Rychlik, 1995). En tal sentido, para analizar el comportamiento diferente observado para las dos parejas de cebadores bajo las condiciones ensayadas, se calcularon las energías libres (dG) asociadas a las estructuras secundarias que se pudieron formar durante la hibridación de los cebadores **IIa** y **IIb** con los moldes de ADNc. En la tabla 19 se muestran los valores dG obtenidos según el programa *2-state hybridization server* (Zuker, 2003).

Tabla 19. Valores de energía libre (dG), obtenidos según el programa *2-state hybridization server* (Zuker, 2003), para los híbridos formados entre los cebadores IIa y IIb con el ADN molde durante el hibridación de la PCR, a las temperaturas de 60ºC y 70ºC.

Híbrido formado durante la PCR	Valores de dG (kcal/mol) a diferentes temperaturas	
	60ºC	**70ºC**
Cebador IIa con ADNc CVd-IIa	-12.8	-9.8
Cebador IIa con ADNc CVd-IIb	-8.2	-5.7
Cebador IIb con ADNc CVd-IIa	-11.4	-8.7
Cebador IIb con ADNc CVd-IIb	-17.8	-14.7

Según muestra la tabla 19 los valores más bajos de mínima de energía libre (dG) para cada temperatura analizada correspondieron a los híbridos que forman cada uno de los cebadores con el ADNc de la secuencia hacia el cual fue dirigido su diseño. Dentro de ellos, los híbridos formados por el cebador **IIa** mostraron valores de dG superiores para ambas temperaturas, lo cual indica que son las formaciones menos estables y por tanto las que menos tienden a mantenerse, sobre todo, cuando se aumenta la temperatura a 70ºC a la que, como se describió anteriormente, este cebador no fue capaz de amplificar

a ninguno de los dos tipos de variantes.

Por su parte, los híbridos formados por el cebador **IIb** con el ADNc de CVd-IIa mostraron valores más bajos de energía libre, incluso cuando se aumentó la temperatura de hibridación a 70ºC. Esto refleja la gran estabilidad de estos híbridos durante la hibridación, lo cual permitió que hubiese amplificación inespecífica. En este caso, el acortamiento del tiempo de hibridación a 20s tuvo una implicación determinante en lograr la especificidad deseada de la reacción que permitiera la discriminación de las variantes de CVd-IIa y CVd-IIb.

Al comparar los valores de la energía libre de los híbridos que forma el cebador **IIa** con el ADNc de CVd-IIb a 60ºC y el del cebador **IIb** y el ADNc de CVd-IIa a 70ºC, llama la atención el hecho de que la diferencia entre ellas es muy pequeña (0.5 kcal/mol) y sin embargo en el primer caso no se obtuvo amplificación y en el segundo sí. Cuando se compararon las estructuras secundarias de mínima energía libre formada por estos híbridos se pudo observar además diferencias en la conformación (figura 27).

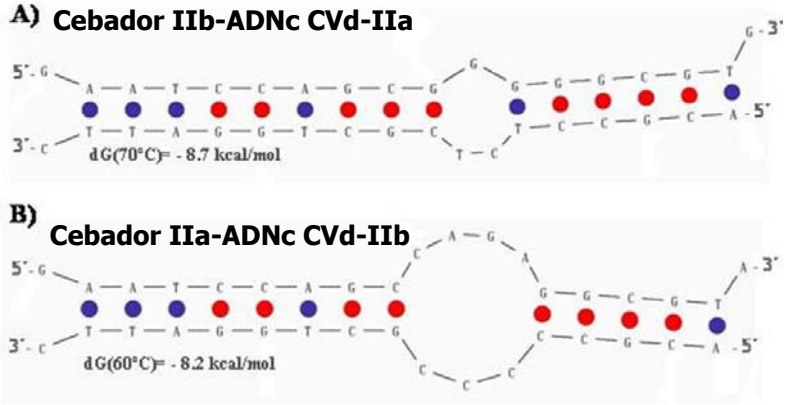


Figura 27. Estructuras secundarias de mínima energía libre obtenidas por el programa *DNA mfold server*, para híbridos formados durante el anillamientto de la PCR. **A)** Híbrido entre el cebador **IIb** (cadena superior) y el ADNc de CVd-IIa (cadena inferior); **B)** híbrido entre el cebador **IIa** (cadena superior) y el ADNc de CVd-IIb (cadena inferior). En ambos casos se indica el valor de energía libre (dG).

Según muestra la figura 27A, la no complementariedad total entre el cebador **IIb** y el ADNc de CVd-IIa provoca que la base del extremo 3´ del cebador quede libre y que luego de una zona apareada de seis pares de bases, se forma un bucle que involucra a un nucleótido del cebador y a dos del ADNc. No obstante, esta estructura permite que tenga lugar la reacción de amplificación. Sin embargo, en la estructura formada por el cebador **IIa** y el ADNc de CVd-IIb (figura 27B), aunque igualmente la base del extremo 3´ del cebador queda desapareada, la zona de apareamiento que le sigue se acorta a cinco pares de bases y el bucle que se forma involucra cuatro nucleótidos del cebador y tres del ADNc. Esta estructura, a pesar de tener un valor de dG similar al de la estructura descrita anteriormente, pudiera estar implicada en el hecho de que no hubo amplificación.

Al realizar la PCR *in silico* mediante el programa Oligo 6.31 a las secuencias del HSVd informadas en la base de datos, se observó que para las 30 variantes que mostraban la secuencia motivo característica de CVd-IIa se predijo amplificación cuando se empleó como cebador homólogo el **IIa** y, en todos los casos, los valores de la eficiencia de apareamiento (P.E) fueron de 368. Los productos obtenidos de manera *in silico*, mostraron las tallas esperadas de 286-292 pb. Para estas 30 variantes el valor de P.E.

obtenido cuando el cebador homólogo fue el **IIb** fue de 59, o sea, muy por debajo de 170 que es el valor prefijado para la posibilidad de ocurrencia de amplificación. Por lo tanto, no se predijo la obtención de producto de amplificación en las variantes tipo CVd-IIa cuando se utilizó el cebador **IIb**.

En el caso de las 49 secuencias del HSVd portadoras de la secuencia motivo específica de CVd-IIb, se predijo amplificación para 46 cuando se utilizó como cebador homólogo el **IIb**. Los productos igualmente mostraron las tallas esperadas, según correspondiera, con longitudes de 283-292 pb y el valor de P.E. para estos casos fue de 526. Cuando estas variantes fueron ensayadas con el cebador homólogo **IIa** los valores de P.E. estuvieron entre 30-50, lo cual predice la no ocurrencia de amplificación.

Las tres variantes tipo CVd-IIb en las que no se predijo producto de amplificación con el cebador homólogo **IIb** fueron HSVd.cit27, HSVd.cit28 y HSVd.cit79, las cuales mostraron un valor de P.E. de 118. Aunque este valor de P.E. es inferior al propuesto por los autores del programa Oligo en el intervalo donde se predice la obtención óptima de los productos de PCR (170-210), está relativamente cercano al valor mínimo y no necesariamente indica que no pueda tener lugar la amplificación.

Por otra parte, se analizaron las variantes del HSVd de cítricos informadas en la base de datos (Pelchat et al., 2003) y consideradas como intermedias -ya que en ellas no se detectó la totalidad de los cambios característicos de las variantes tipo CVd-IIa o CVd-IIb definidas en el dominio variable- cuyos resultados se muestran en la tabla 20.

Según se muestra, no fue necesaria la presencia de los tres cambios en la cadena superior del dominio variable, ya sea de CVd-IIa o CVd-IIb, para que se predijera amplificación *in silico*. Además, en el caso de la amplificación con el cebador **IIb** se observó que no todos los cambios característicos de esta variante tuvieron la misma implicación sobre los resultados de la reacción. Esto se pudo apreciar, por ejemplo, en el caso de la variante HSVd.cit087, la cual presentó solamente el segundo y tercer cambio tipo CVd-IIb y no amplificó con el cebador específico, y sin embargo, en la variante HSVd.cit41, que contenía el primer y segundo cambios de CVd-IIb, se predijo amplificación. En ninguno de los casos analizados para las variantes intermedias del HSVd en cítricos se predijo amplificación con ambos cebadores homólogos.

Cuando se compararon los resultados obtenidos de la PCR *in silico* con la caracterización biológica del aislado de donde provino la variante a analizar, se pudo apreciar que hubo correspondencia en el caso de los aislados no causantes de cachexia. Sin embargo, se encontraron dos variantes que fueron caracterizadas de un aislado causante de cachexia (HSVd.cit089 y 90, provenientes del aislado PM 26-X en el hospedante lima), que se predijeron como positivas para el cebador **IIa**.

Tabla 20. Resultados de la predicción de amplificación de las variantes del HSVd de cítricos intermedias, obtenido mediante el programa Oligo (versión 6.31, Wojciech y Piotr Rychlik, 1989-2000), con los cebadores homólogos **IIa** y **IIb**.

Variantes intermedias del HSVd en cítricos	Números de cambios en la secuencia motivo del dominio V.	Comportamiento biológico*	Resultados de la amplificación con los cebadores homólogos/ Valores de P.E.	
			IIa	IIb
HSVd.cit 083	1 y 2 de CVd-IIa; y 3 de CVd-IIb	No cachexia[a]	+/215	-/59
084		No cachexia[a]	+/215	-/59
085		No cachexia[a]	+/215	-/59
086		No cachexia[a]	+/215	-/59
089		Cachexia[b]	+/215	-/59
46		?	+/215	-/59
54		No cachexia	+/215	-/59
82		?	+/215	-/59
087	1 de CVd-IIa; 2 y 3 de CVd-IIb.	No cachexia[a]	-/155	-/85
41	1 y 2 de CVd-IIb, y 3 de CVd-IIa	Cachexia	-/39	+/292
67	Los 3 de CVd-IIa, pero no contiene los de la cadena inferior.	?	+/368	-/59
80		?	-/39	+/526
090		Cachexia[b]	+/368	-/59

*: Comportamiento biológico referido en la base de datos (**www.subviral.med.uottawa.ca**). [a] variantes obtenidas en el presente trabajo a partir del aislado no patogénico CL 1324; [b] variantes del aislado patogénico PM 26-X obtenidas a partir de lima en este trabajo; **?** no se refiere; resultados de la amplificación **+**: positivas (P.E.≥170) ; **-**: negativas (P.E.<170).

4.3.2. Establecimiento de un método de diagnóstico con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio

Las muestras foliares de plantas de pepino inoculadas con los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de cítricos provenientes de campo mostraron señales de hibridación específicas para el HSVd en todos los tiempos analizados. Estos resultados indican no sólo la replicación del viroide, sino su movimiento dentro de la planta y el éxito de la inoculación en plantas de pepino a partir de muestras cítricas de campo. Los valores de densidad óptica obtenidos en la señal de hibridación para cada tipo de hoja muestreada en los diferentes tiempos se presentan en la figura 28.

Puede apreciarse de manera general que las señales de hibridación fueron más fuertes en las muestras analizadas a los 14 días de la inoculación, ya fuese en las hojas verdaderas primeras o superiores. La prueba *t* de *Student* reveló que no existieron diferencias significativas ($p<0.05$) entre la señal obtenida para diferentes hojas en el mismo tiempo de muestreo, en cada réplica de las plantas de pepino analizadas. Para cada comparación realizada el valor del estadígrafo *t* se mostró en el rango de 2.77 a 4.30.

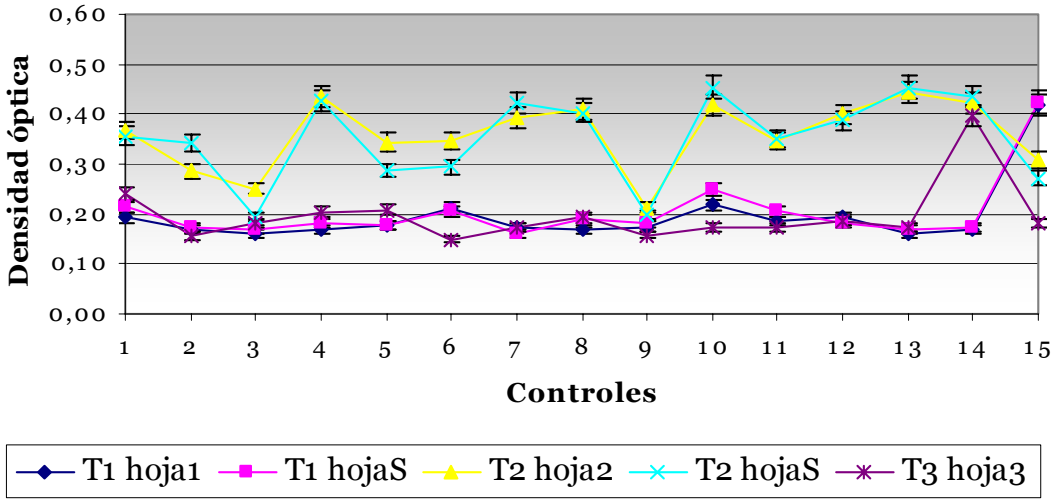


Figura 28. Valores medios de densidad óptica para las señales de NASH a diferentes tiempos y hojas muestreadas de las plantas de pepino inoculadas con extractos de ácidos nucleicos de 15 plantas de cítricos portadoras del HSVd provenientes de campo. T1: 9 días posinoculación (PI); T2: 14 días PI; T3: 21 días PI; S: hoja superior.

El porcentaje de detección en las muestras foliares inferiores fue del 93,6, 100 y 100 % para los análisis realizados a los 9, 14 y 21 días posinoculación, respectivamente. Mientras que fue positiva en el 100% de las muestras evaluadas de hojas verdaderas superiores a los 9 y 14 días. A los 21 días aunque se fue posible detectar la presencia del HSVd sólo se pudo muestrear una hoja debido al deterioro de las plantas.

Al analizar las plantas de pepino inoculadas con los extractos de *C. volkameriana* Ten y Pasq. se detectó la presencia del HSVd con diferencias en las proporciones de detección en función de la zona de la planta de cítrico empleada para la inoculación, la hoja de pepino muestreada y el tiempo posinoculación en el que fueron analizadas (tablas 21 y 22).

Tabla 21. Proporción de controles de *C. volkameriana* Ten y Pasq. empleados como inóculos en los que se determinó la presencia del HSVd mediante la NASH en la **primera hoja verdadera** de plantas de pepino a diferentes tiempos posinoculación con extractos de de diferentes regiones de la planta.

Región de la planta de *C. volkameriana* Ten y Pasq. que se tomó como inóculo	9 días posinoculación	14 días posinoculación
Inferior	11/14 [a]*	12/14 [a]
Medio	10/14 [a]	9/14 [a]
Superior	10/14 [a]	10/14 [a]

* Letras diferentes indican diferencias significativas para $p<0.05$ (error estándar: 0.047) mediante la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998).

Tabla 22. Proporción de controles de *C. volkameriana* Ten y Pasq. empleados como inóculos en los que se determinó la presencia del HSVd mediante la NASH en la **hoja verdadera superior** de plantas de pepino a diferentes tiempos posinoculación con extractos de de diferentes regiones de la planta.

Región de la planta de *C. volkameriana* Ten y Pasq. que se tomó como inóculo	9 días posinoculación	14 días posinoculación
Inferior	11/14 [ab]*	14/14 [a]
Medio	8/14 [b]	13/14 [ab]
Superior	10/14 [b]	10/14 [b]

* Letras diferentes indican diferencias significativas para $p<0.05$ (error estándar: 0.044) mediante la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998).

La tabla 21 muestra que la detección del HSVd a partir de los extractos de la primera hoja verdadera de las plantas de pepino inoculadas no difirió significativamente en relación a la región de la planta de *C. volkameriana* Ten y Pasq. que se tomó como inóculo, ni al tiempo posinoculación en el que se analizaron las plantas de pepino. Sin embargo, cuando se analizaron las hojas verdaderas superiores de las plantas de pepino inoculadas se observaron diferencias significativas. En este caso, cuando la fuente de inóculo correspondió a la región inferior de las plantas de *C. volkameriana* Ten y Pasq. y el análisis de los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de pepino se realizó a los 14 días posinoculación, se detectó la presencia del HSVd en el 100% de los inóculos. Este valor no difirió significativamente de los obtenidos a los 9 días posinoculación y a los 14 días en el caso en que el inóculo provino de la zona media de las plantas de cítricos, pero mostró diferencias significativas con el resto de los casos comparados.

Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la detección del HSVd en las plantas de *C. volkameriana* Ten y Pasq. según la región de la planta utilizada como fuente de inóculo para las plantas de pepino y el tiempo posinoculación de estas en las que se analizan los extractos de ácidos nucleicos mediante NASH, se determinó que las condiciones de muestreo que permitieron obtener mejores resultados fueron las hojas superiores a los 14 días posinoculación, similar a lo observado cuando el inóculo provino de plantas de cítricos de campo.

A partir de los resultados obtenidos en la detección del HSVd en plantas de cítricos provenientes de campo y del patrón *C. volkameriana* Ten y Pasq. se propone una metodología en la cual se emplea la planta de pepino como amplificador biológico intermedio:

Metodología propuesta para la detección del viroide del enanismo del lúpulo (HSVd) en muestras cítricas de campo con el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio y posterior análisis por hibridación de los ácidos nucleicos

1- Toma de muestra de las plantas cítricas de campo

Se deben tomar ramas jóvenes de la planta de diferentes zonas, incluyendo en ellas la región inferior. Las muestras debidamente identificadas se llevarán al laboratorio para su procesamiento.

2- Extracción de los ácidos nucleicos e inoculación en plantas de pepino.

Para la extracción de ácidos nucleicos se tomará fundamentalmente la corteza de los tallos, y el procedimiento se hará según el descrito por Semancik *et al.* (1975) a partir de 5 gramos de material vegetal. El extracto final puede conservarse a -20ºC hasta su utilización.

La inoculación en plantas de pepino (*Cucumis sativus* L. cv Japonés) se realizará cuando las plantas cuenten con la primera hoja verdadera, provocando pequeñas heridas en el tallo de la planta, con el uso de una cuchilla previamente desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio al 1 %. Sobre estas heridas se aplicarán 10 µl del inóculo, y se cubrirán con varias capas de cinta plástica adhesiva *(parafilm)*. Por cada extracto a analizar se inocularán dos plantas de pepino. Las plantas se mantendrán en condiciones de casa de malla, a temperatura ambiente.

3- Toma de muestras de las plantas de pepino y extracción de ácidos nucleicos.

A los 14 días posinoulación se tomarán hojas de las plantas de pepino, preferiblemente de la parte superior. La extracción de ácidos nucleicos se realizará según el procedimiento modificado de Querci *et al.,* 1995.

5- Realización de la hibridación de ácidos nucleicos con sondas específicas al HSVd.

La fase acuosa de los extractos se aplicará directamente sobre membranas de nylon cargadas positivamente y se fijarán por exposición a 80°C durante dos horas. Se deberán incluir al menos dos controles positivos y dos negativos.

La hibridación se realizará según describe Palacio-Bielsa *et al.* (2004) empleando una sonda de ADN específica al HSVd marcada con digoxigenina obtenida mediante PCR.

Luego de 16 horas de hibridación se realizarán los lavados descritos y se realizará la detección usando un sustrato quimioluminiscente.

La evaluación de los resultados se realizará de manera cualitativa: en las posiciones donde aparezca una mancha de señal de hibridación se considerará como positiva (en comparación con los controles positivos y negativos). Las plantas que resulten positivas serán debidamente eliminadas.

Comparación de la metodología propuesta con métodos de referencia para la detección del HSVd

La tabla 23 muestra los resultados obtenidos en la detección del HSVd en 15 muestras de cítricos provenientes de campo, mediante dos métodos de referencia y la metodología propuesta en este trabajo (inoculación en plantas de pepino y detección por hibridación de ácidos nucleicos).

Tabla 23. Resultados de la detección del HSVd a partir de muestras de cítricos provenientes de campo mediante dos métodos de referencia y el propuesto (inoculación en plantas de pepino y posterior análisis por NASH). Los valores indican la cantidad de muestras consideradas positivas.

Cantidad de muestras	**Métodos de referencia[1]**				**Método propuesto**	
	Clemelín 11-20-NASH		**Clemelín 11-20-RT-PCR**		**Pepino-NASH**	
	Síntomas	NASH	Síntomas	RT-PCR	Síntomas	NASH
15	7	15	7	15	0	15

[1]Métodos referidos por Velázquez, 2004 y Pérez, 2004a.

Los resultados obtenidos por los métodos de referencia ensayados mostraron la presencia del HSVd en las 15 muestras analizadas. En ambos ensayos la utilización de la planta indicadora clemelín 11-20 permitió identificar la existencia de variantes tipo CVd-IIb en siete de las 15 muestras analizadas, las cuales mostraron síntomas específicos de cachexia (figura 29). Esto indica que en las muestras que no indujeron síntomas en la planta indicadora estaban presentes variantes tipo CVd-IIa o intermedias, ya que se ha comprobado previamente que en clemelín 11-20 no tiene lugar el fenómeno de interferencia entre CVd-IIa y CVd-IIb referido para cidro Etrog Arizona 861 S-1 (Pérez, 2004a).



Figura 29. Síntomas de acumulación de goma inducidos en plantas de clemelín 11-20 por la presencia de variantes del HSVd causantes de cachexia en una de las muestras analizadas. Se señala la acumulación de goma en la zona donde se descortezó para la evaluación de los síntomas.

El análisis de las 15 muestras de campo mediante el método propuesto en el cual se combina el empleo de plantas de pepino como amplificadora intermedia y posterior análisis por hibridación de ácidos nucleicos, permitió detectar al HSVd en la totalidad de ellas. La comparación de este método con los resultados obtenidos por los de referencia indicó un 100% de coincidencia entre ellos.

En el caso del método que se evalúa no se observó la aparición de síntomas en las plantas de pepino inoculadas, por lo que a través de la sintomatología no se pudo discriminar entre variantes patogénicas o no.

Evaluación de parámetros de desempeño

El límite de detección obtenido en la hibridación de ácidos nucleicos al evaluar los extractos de ácidos nucleicos de las plantas de pepino inoculadas fue de 1:10. Por su parte, los resultados de la evaluación de los controles positivos y negativos por la metodología propuesta se muestran en la tabla 24 y en la 25 los parámetros de desempeño determinados sobre la base de estos resultados.

Tabla 24. Valores básicos para estimar los parámetros de desempeño de la detección del HSVd mediante NASH con el uso de las plantas de pepino como amplificador biológico intermedio.

		Controles de referencia	
		Infectados	Sanos
Resultados de la NASH a partir de extractos de pepino inoculados	Positivos	51 (Vp)	0 (Fp)
	Negativos	1 (Fn)	44 (Vn)

Tabla 25. Parámetros de desempeño determinados para la detección del HSVd mediante la metodología propuesta.

Parámetros	NASH
Especificidad diagnóstica (D-SP)	100%
Sensibilidad diagnóstica (D-SN)	98.0%
Eficacia (E)	98.9%
Valor predictivo de positividad (Vpp)	100%
Valor predictivo de negatividad (Vpn)	97.7%

El método establecido, en el cual se utiliza la planta de pepino variedad japonés como amplificador biológico para la posterior detección del HSVd mediante la NASH, mostró una eficacia de 98.9%.

5. DISCUSIÓN

5.1. La variabilidad molecular de poblaciones del HSVd en aislados cítricos cubanos se comporta de manera diferente en relación al carácter patogénico y hospedante

Entre los principales factores que influyen en la composición de poblaciones de los viroides, se encuentran los errores que se introducen durante la replicación y la selección natural en el establecimiento de la "población adaptada" (Fagoaga *et al*., 1995, Palacio-Bielsa *et al.,* 1999). Esto determina que la secuencia "maestra", variante más frecuente dentro de la población, se defina como aquella o aquellas de mayor eficacia biológica en un entorno determinado. En este sentido, los análisis de los perfiles conformacionales de las cadenas simples de ADNc (SSCP) y la secuenciación de clones del HSVd obtenidos a partir de las poblaciones de los aislados CL 13-24 y PM 26-X, en los diferentes hospedantes analizados, mostraron la existencia de variabilidad. No obstante, entre las variantes de cada población con respecto a la secuencia maestra la identidad se mantuvo por encima del 94%. La identificación de secuencias maestras dentro de cada población y de otras variantes relacionadas, resulta consistente con el criterio de que los viroides se propagan en sus hospedantes como poblaciones heterogéneas (*cuasiespecies*) (Semancik, 1999).

Según las diferencias observadas en los perfiles del SSCP obtenidos en este trabajo, se infiere que en las poblaciones del aislado PM 26-X en hospedantes cítricos existe un mayor número de variantes del HSVd que se adaptan al sistema estudiado que con el aislado CL 13-24. Este comportamiento entre la variabilidad de la población de un aislado patogénico (PM 26-X) y uno no patogénico (CL 13-24) fue similar al obtenido por Palacio-Bielsa *et al.* (1999), donde no se halló heterogeneidad mediante el SSCP en aislados no patogénicos. No obstante, la variabilidad más baja hallada en el aislado patogénico PM 26-X en el hospedante pepino evidencia que esta no radica únicamente en el carácter de patogenicidad del aislado, sino, que sobre ella puede además influir el hospedante mediante la selección sobre la población viroidal.

En estudios realizados en la caracterización molecular de las especies CDVd y CVd-IV de viroides de cítricos en Cuba por Velázquez (2004), se encontró una variabilidad por el SSCP similar a la observada en el presente trabajo para los aislados CL 13-24 en cidro y PM 26-X en pepino. Desde el punto de vista biológico, las especies CDVd, CVd-IV y HSVd -esta última en pepino-, no están asociadas a enfermedades bien caracterizadas (Palacio-Bielsa, 1999; Velázquez, 2004), por lo que el comportamiento similar de la poca variabilidad mediante el SSCP pudiera sugerir algún tipo de relación entre este aspecto y el hecho de que no ocasionen enfermedades.

Por su parte, los análisis de las secuencias del HSVd dentro de cada población estudiada mostraron que la variabilidad fue mayor en relación a la predicha por el SSCP. Es importante tener en cuenta que por esta técnica sólo se detectan cambios en la conformación de la molécula de ADN que impliquen

diferencias en su movilidad. Por lo tanto, aquellas variaciones en la secuencia del viroide que conserven la conformación de la cadena de ADN no serán detectadas por este método electroforético y no reflejarán la existencia de variabilidad entre las secuencias. Además, el hecho de que secuencias idénticas hayan mostrado diferencias en el perfil electroforético denota que las hebras de ADN pueden adoptar más de una conformación estable (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999).

El SSCP es un método ampliamente utilizado para la caracterización de genes relacionados con determinadas enfermedades en humanos, animales y virus (Enomoto *et al.,* 1994; Chen *et al.,* 1995; Rubio *et al.,* 1996) y, más recientemente, ha sido introducido para el estudio de la variabilidad en viroides (Palacio-Bielsa *et al.,* 1999; González *et al.*, 2004; Velázquez, 2004). El mismo brinda una valiosa información acerca de la presencia de variantes de secuencias dentro de la población que se analiza y permite guiar la selección de las mismas para análisis posteriores. No obstante, en las condiciones utilizadas no constituye un método definitorio en los estudios de variabilidad para el HSVd, donde cambios muy puntuales en pocos nucleótidos son responsables de la expresión de síntomas en las plantas sensibles (Reanwarakorn y Semancik, 1998). En el caso del análisis de poblaciones del CEVd, se han establecido condiciones que le aportan una mayor resolución a esta técnica, de manera que permite una mejor discriminación entre secuencias con poca variación de nucleótidos. Sin embargo, no ha sido posible extender estas condiciones para el HSVd (Palacio-Bielsa, 1999), por lo que continúa la necesidad de establecer mejoras en la técnica para su aplicación al estudio de este viroide con el fin de lograr una mayor discriminación entre secuencias que difieran en pocos nucleótidos.

La identidad entre las variantes de secuencia del HSVd en las poblaciones cubanas estudiadas y las informadas en la base de datos para ARN subvirales (Pelchat *et al.,* 2003) fue superior al 93% lo cual confirma que pertenecen a dicha especie de viroide, teniendo en cuenta que según el criterio de Flores *et al*. (1998) las secuencias de viroides que muestran más de un 90% de homología entre sí se consideran miembros de la misma especie. No obstante, los análisis filogenéticos no permitieron establecer un agrupamiento según el origen geográfico de las secuencias, lo que pudiera ser resultado del intercambio de material vegetal infectado por el HSVd entre las diferentes zonas citrícolas del mundo (Ito *et al.,* 2002). De las 27 secuencias informadas a la base de datos como resultado de este trabajo, 26 representaron variantes nuevas, lo cual no resulta sorprendente teniendo en cuenta la alta tasa de introducción de errores de la ARN polimerasa durante la replicación de los viroides (Moya *et al,* 2000). Estas variantes constituyen además, las primeras del HSVd informadas en Cuba.

Otro criterio que se tuvo en cuenta para el análisis de la variabilidad en las poblaciones cubanas del HSVd bajo estudio, fue la presencia o ausencia de la secuencia motivo en el dominio variable responsable del carácter patogénico o no de las variantes en cítrico. Según describen Reanwarakorn y Semancik (1999a) y Palacio-Bielsa y Duran-Vila (2000), la secuencia motivo de las variantes no causantes de cachexia involucran cambios específicos en relación a las variantes inductoras de cachexia. Sin embargo, el análisis de las variantes de secuencias obtenidas a partir del aislado no patogénico Cl

13-24 reveló que en ninguna de ellas se presentaron la totalidad de los cambios informados para este tipo de variante, sino que constituyeron variantes intermedias. Esto indica que, más que el mantenimiento de una secuencia específica en las variantes no inductoras de cachexia para no provocar la enfermedad, pudiera ser la ausencia de al menos uno de los cambios del tipo patogénico CVd-IIb la causa de que no se manifieste la misma o sus síntomas típicos.

Por su parte, la identificación de la secuencia motivo descrita para las variantes del HSVd causantes de cachexia en el aislado patogénico PM 26-X, reveló diferencias significativas entre las poblaciones obtenidas a partir de cidro y pepino con respecto a lima. El análisis de este comportamiento en relación a la respuesta biológica de los hospedantes cítricos de origen, mostró en cidro la mayor fracción de variantes portadoras de esta secuencia motivo. El cidro está identificado como un hospedante altamente sensible a la replicación de las especies de viroides de cítricos identificadas y manifiesta síntomas específicos frente a la mayoría de ellas, aunque no para las variantes del HSVd causantes de cachexia (Duran-Vila *et al.,* 1988). Sin embargo, cuando la planta hospedante fue lima, teniendo como patrón a *Citrus macrophylla* Wester que es tolerante a la cachexia y donde se alcanzan niveles de replicación inferiores que en cidro, se observó un menor índice de variantes que contenían la secuencia motivo características de las variantes patogénicas. Estos resultados aportaron evidencias de que el hospedante ejerce cierta presión de selección sobre la población y que, en los casos analizados, esta se manifiesta a nivel de la secuencia motivo que define el carácter de inductor o no de cachexia.

Uno de los elementos claves en la actividad biológica de los viroides lo constituye la estructura secundaria adoptada por las secuencias, la cual puede ser funcional o proveer señales de unión con factores del hospedante (Tabler y Tsagris, 2004). La formación de estas estructuras está determinada, en primera instancia, por su secuencia nucleotídica y además, por factores del entorno biológico que pueden ejercer una presión de selección sobre ella. El análisis de las estructuras secundarias predichas para las variantes del HSVd presentes en las poblaciones estudiadas evidenció el mantenimiento de una conformación en forma de varilla para ambos aislados, la cual ha sido informada como la más frecuente para esta especie (Kofalvi *et al.,* 1997; Flores *et al.,* 2004). Sin embargo, también a este nivel se pudo observar variabilidad intra e inter poblacional, ya que la conservación de fragmentos de simple y doble cadena no fue estricta. Esto pudiera ser resultado de la variación entre las secuencias nucleotídicas, aunque no fue posible determinar esta relación en todos los casos.

Para los viroides se ha descrito que las estructuras mas ramificadas son las que mayor probabilidad tienen de asociarse a factores del hospedante que conduzcan al desarrollo de los mecanismos de patogénesis (Gruner *et al.,* 1995). Resulta interesante en este sentido el hecho de que solo en las poblaciones del aislado patogénico PM 26-X se identificaran variantes en las que se predijo la formación de estructuras secundarias ramificadas que involucraban todos los dominios de la molécula. Las diferencias encontradas en estas secuencias, en relación a la secuencia maestra de la poblaciones de las cuales provenían (que mostraron la conformación de varilla) fue solo de un nucleótido (a excepción de la

variante 26x-c26), por lo que podría esperarse que los cambios en la conformación de las estructuras secundarias fueran menores. Esto corrobora el criterio de que existen determinadas zonas en la molécula de los viroides donde simples cambios pueden inducir una modificación drástica en la conformación de la estructura secundaria (Palacio-Bielsa, 1999). Aunque tales estructuras enmarcaron a un número muy pequeño de variantes, y quizás pudieran corresponderse con secuencias que de manera aislada no sean competentes, no debe desestimarse su posible papel dentro de la dinámica de la población en el desempeño de sus propiedades biológicas (Gruner *et al.,* 1995).

Otro aspecto que resultó de gran interés fue el hecho de que, independientemente de la variabilidad hallada en las poblaciones bajo estudio, se encontrara la formación de un bucle de dos bases de uracilo (U) en la cadena inferior del dominio patogénico, según la predicción de la estructura secundaria. Este bucle se mantuvo constante en todas las variantes estudiadas, tanto en las causantes de cachexia como en las no patogénicas, por lo que su conservación indica que pudiera estar involucrado en funciones no relativas a la patogenicidad. Además, se observó que para el mantenimiento de esta estructura se presentó una co-variación de dos nucleótidos. La manifestación de esta co-variación estuvo en dependencia de la longitud de la secuencia, de manera que se presentaron las dos bases en las variantes con longitudes entre 294-295 nt y no se presentaron en las de más de 295nt. Otros autores han informado la presencia de esta estructura de bucle en variantes del HSVd provenientes de aislados de plantas no cítricas (Kofalvi *et al.,* 1997). Sin embargo, no se ha asociado a esta la existencia de una co-variación debido a que tales estudios fueron realizados solamente con variantes del HSVd de longitudes superiores a los 295 nt.

La presencia de la co-variación identificada para el mantenimiento del bucle de dos uracilos refuerza la idea de que su formación en el dominio patogénico pudiera estar involucrado en algunas de las funciones básicas que tienen lugar durante la infección (ej., replicación y movimiento en la planta, entre otras). Esto soporta la idea de que, a pesar de que se acepta el criterio de la existencia de dominios bien definidos en la estructura secundaria del viroide como responsables de determinadas funciones biológicas, estas pueden estar determinadas por más de un dominio (Reanwarakorn y Semancik 1998; 1999a).

Por otra parte, otro modo de explicar eventos evolutivos en los viroides es la determinación, utilizando como base los análisis filogenéticos, de la existencia de cambios en la secuencia nucleotídica que implican otros. Las co-variaciones de residuos involucrados en la conformación de la estructura secundaria constituyen un argumento importante para destacar la relevancia biológica de tales estructuras. Se puede inferir de ellas el hecho de que si las variaciones resultan estables, las mismas podrían afectar la patogeniciad de las moléculas (Kofalvi *et al.,* 1997). Estudios basados en los análisis filogenéticos de variantes del HSVd predicen que las co-variaciones encontradas en el dominio patogénico pueden influir en la conformación local y la

estabilidad de cambios que, probablemente, afecten la patogenicidad (Palacio-Bielsa y Duran Vila 2000).

La variabilidad hallada en las poblaciones de dos aislados cítricos cubanos del HSVd permitió identificar nuevas secuencias, en comparación a las informadas previamente en base de datos, las cuales constituyeron además las primeras informadas en Cuba para este voroide. Las diferencias observadas en los estudios de caracterización molecular permitieron identificar una mayor variabilidad en la población del aislado patogénico. En el mismo varió la fracción de variantes que presentaron la secuencia motivo causante de cachexia descrita en el dominio variable en relación con el hospedante de origen, lo cual constituye una evidencia de la selección ejercida por este sobre la población viroidal. De esta manera los resultados presentados en este trabajo contribuyen no sólo al estudio y conocimiento de los viroides en Cuba, sino que además, brindan elementos moleculares sobre estas entidades que pueden servir de base para la caracterización de poblaciones en cítricos u otros hospedantes.

5.2. La estructura secundaria predicha para el HSVd sugiere una posible selección del hospedante

La predicción de las estructuras secundarias de mínima energía libre para las secuencias del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) mostró que la estructura en forma de varilla fue la adoptada por la mayoría de las variantes analizadas. También se presentaron otras conformaciones, como las de tipo cruciforme que involucraron ramificaciones de los dominios patogénico y central y otras que implicaron un reordenamiento de toda la molécula, esta última fue adoptada por muy pocas secuencias.

Los análisis de las estructuras secundarias predichas mostraron que hubo variaciones de nucleótidos sobre un dominio que tuvieron implicaciones sobre la estructura secundaria de otros. No obstante, es importante destacar que la mayoría de los cambios observados en las variantes del HSVd en cítricos involucraron modificaciones de la estructura sobre el mismo dominio, o muy cerca del sitio de la variación. De forma general, los cambios en la secuencia cuando involucraron una zona apareada, tuvieron una mayor implicación sobre la variación de la estructura secundaria de la molécula que cuando implicaron bucles. En este sentido también fue determinante el tipo de nucleótido que cambió, pues de él depende la posibilidad de formación de zonas apareadas o no. Estos resultados son lógicos si se tiene en cuenta que la formación de la estructura secundaria está estrechamente relacionada con la estabilidad de la molécula (Zuker, 2003).

Para lograr una mejor caracterización de las conformaciones que podían ser adoptadas por dominio se hizo la identificación de grupos conformacionales en cada uno, de los cuales sólo la información reflejada en los dominios patogénico y variable permitieron establecer relaciones entre la adopción de una conformación específica, en la estructura de varilla o cruciforme, con el hospedante de origen. Estas relaciones condujeron a un agrupamiento en el cual se ubicaron las variantes de viroides,

atendiendo a la adopción de determinado grupo conformacional (figura 23). Otros autores han realizado estudios previos para determinar la existencia de selección del hospedante sobre la variación de las secuencias nucleotídicas, como una expresión de la interacción que se establece entre el ARN viroidal y elementos de la planta hospedante (Shikata, 1990; Hsu *et al.,* 1994; Kofalvi *et al.,* 1997). Los mismos estuvieron basados en las relaciones y distancias filogenéticas y, aunque permitieron el agrupamiento de las secuencias del HSVd en cinco grupos, no fue posible asociarlos directamente a la selección que pudiese ejercer el hospedante sobre las variantes.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, la división descrita a partir de los análisis del dominio patogénico soportó, en parte, la definición de algunos de los grupos descritos por Kofalvi *et al.* (1997), aunque en este caso se observó una mayor diferenciación en cuanto a los hospedantes. En este sentido, se mantuvieron de igual manera los grupos que según este autor denominó como **tipo cítrico** (que agrupa variantes de cítrico y pepino) y el **tipo lúpulo** (que contiene variantes de vid y lúpulo). Sin embargo, según este autor existe un grupo que está formado por tres secuencias de vid (al que no le da nombre), que desde el punto de vista de los análisis filogenéticos están más alejadas del resto de las variantes identificadas en este hospedante. Los análisis de la estructura secundaria revelaron que, no obstante las diferencias entre las secuencias nucleotídicas de estas variantes, la predicción de la adopción de los $\mathbf{G_{cf}}$ fue muy similar al del resto de las variantes provenientes de vid. Por lo tanto estos resultados indicaron la no existencia de dicho grupo y que esas secuencias formaban parte del grupo **tipo lúpulo**. En el caso del **tipo ciruelo** agrupó a variantes de este hospedante y, además, de albaricoquero y almendro. En este último se observó, según la comparación de las conformaciones, que las variantes provenientes de almendro no adoptaron exactamente la misma conformación que las de los otros dos hospedantes, por lo que se subdividió en dos grupos, uno de los cuales contuvo a las variantes con una conformación en forma de cruz.

El número de variantes del HSVd informadas en los hospedantes almendro, papa, y pepino es muy pequeño (dos, uno y dos, respectivamente) por lo que la información que se obtiene, tanto de la secuencia como de la estructura secundaria de la molécula, es muy limitada y no permite un estudio más amplio para lograr una correcta ubicación en los grupos descritos.

La adopción de grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio variable permitió establecer una diferenciación entre variantes a partir de hospedantes diferentes, que según lo observado en el dominio patogénico se ubicaron en el mismo grupo. Este hecho fue más evidente en el grupo que inicialmente se denominó **tipo cítricos,** en el que se incluían variantes de cítrico y pepino. Las variantes provenientes de cítricos mostraron tendencia a la adopción de tres conformaciones que no fueron adoptadas por las variantes provenientes de pepino. Por lo que, a este nivel, se establece una discriminación entre ambos hospedantes.

El análisis realizado en el grupo tipo cítricos (que según los resultados obtenidos en este trabajo agrupa

sólo a las variantes provenientes de este hospedante) enfocado a la relación entre los grupos conformacionales y la presencia de la secuencia motivo en el dominio variable que define el carácter de patogenicidad, permitió reafirmar a este dominio como el discriminante entre las variantes causantes o no de cacxhexia. De acuerdo con datos previos (Reanwarakorn y Semancik 1999a; Palacio-Bielsa *et a1.,* 2004), uno de los aspectos fundamentales en la estructura de esta dominio para las variantes no causantes de cachexia es la formación de un brazo de 8pb. Según lo observado en el presente trabajo no hubo una correspondencia estricta con esta afirmación ya que una de las conformaciones (V_C) adoptadas por variantes no patogénicas (CVd-IIa) no satisfizo esta propuesta, pues en la misma el brazo que se forma tiene una talla de 7pb, descrito inicialmente sólo para las variantes causantes de cachexia (CVd-IIb). En el caso de variantes intermedias, algunas de las cuales se obtuvieron a partir de aislados no causantes de cachexia, no se conservó el brazo de 8pb descrito para las variantes no patogénicas. Esto sugiere que pueden existir secuencias intermedias entre las variantes patogénicas y las no patogénicas, y que la pérdida en el dominio variable de la estructura típica de las secuencias causantes de cachexia está asociada con la incapacidad de causar la enfermedad.

Aquí es importante destacar que en el caso de las variantes del HSVd en cítricos además fue posible asociar determinados $\mathbf{G_{cf}}$ en los dominios patogénico y terminal derecho para las variantes tipo CVd-IIa, CVd-IIb e intermedias. Teniendo en cuenta que en el análisis de las secuencias no fue posible definir los cambios específicos de nucleótidos que inducían el establecimiento de las conformaciones y que en muchos casos se mantuvo la topología de la estructura secundaria, aunque no coincidían las bases de las mismas, estos resultados, aunque predictivos, pudieran apoyar el criterio sobre la importancia del mantenimiento de determinadas estructuras secundarias en los viroides y su implicación con el desarrollo de determinadas funciones incluidos los mecanismos de patogenicidad (Owens *et al.,* 2003).

El objetivo de la comparación de las conformaciones de la estructura secundaria predichas para las variantes del HSVd, más que proponer un sistema para su clasificación, fue encontrar elementos que sugirieran una posible selección del hospedante sobre el establecimiento de la población, que involucrase la tendencia hacia la adopción de determinada conformación en la molécula del viroide. Actualmente, los estudios *in silico* para la predicción de las estructuras secundarias más estables de los ARN constituyen una de las primeras etapas en la determinación de la conformación de esta molécula. Es así que en los últimos 30 años se han desarrollado una serie de algoritmos eficientes con el empleo de métodos dinámicos de programación (Zuker, 2003). Sin embargo, para un mayor acercamiento a la conformación que adopta el ARN en su entorno biológico, es necesario llevar a cabo estudios específicos *in vitro* e *in vivo* que permitan corroborar las predicciones de las estructuras secundarias, identificar posibles sitios de interacción con elementos de la planta hospedante y su función en la actividad biológica, entre otros (Flores *et al.,* 2005).

A pesar de que no fue posible identificar cambios específicos en la secuencia nucleotídica que se relacionaran con la predicción de determinadas conformaciones en la estructura secundaria, esto no indica que no existan. Los viroides, al igual que otros genomas de ARN, tienen una evolución que parece estar restringida por la necesidad de preservar ciertas características de la estructura secundaria (Owens *et al.,* 2003).

El hecho de que se halla predicho que variantes del HSVd de distintos hospedantes tiendan a adoptar determinadas conformaciones de la estructura secundaria refuerza la idea de que esta pueda tener una implicación importante en las propiedades biológicas de los viroides. Aunque no constituyen parámetros para afirmar que determinada estructura secundaria se presenta sólo en un hospedante específico, sugiere que esta puede constituir una expresión de la interacción planta-patógeno. En tal sentido los resultados obtenidos en este trabajo, que señalan una posible selección del hospedante sobre la población del HSVd, constituyen un paso inicial en la búsqueda de determinantes específicos en la molécula de este viroide a nivel de la estructura secundaria. Los mismos resultan novedosos pues toman como criterio de selección las conformaciones predichas a través de la estructuras secundarias, en lugar de la información derivada de las relaciones filogenéticas.

5.3. El dominio patogénico (P) del HSVd pudiera estar involucrado en el movimiento y/o replicación en plantas de pepino

La detección del HSVd en las plantas de pepino inoculadas con variantes provenientes de la población del aislado PM 26-X en cidro, puso en evidencia la competencia de estas secuencias para el sistema estudiado, aunque se observaron diferencias entre ellas. En las plantas inoculadas con la variante 26x-c2 se detectó la presencia del HSVd a las dos horas de inoculación, tanto en los cotiledones como en las primeras hojas verdaderas. El hecho de que esta secuencia halla sido idéntica a la variante maestra del HSVd de la población caracterizada en pepino y que fuese la única detectada alas dos horas posinoculación en la primera hoja verdadera, indica que es más competente para el sistema estudiado. Esto es consistente con el criterio de que la secuencia maestra es la más adaptada dentro de población en un entorno biológico determinado (Palacio-Bielsa *et al.,* 2004).

Llama la atención que en las plantas de pepino inoculadas con la variante 26x-c45, que difirió sólo en el dominio patogénico con respecto a la variante 26x-c2, no se haya detectado al HSVd durante la primera semana posinoculación. Esto sugiere que aunque la variación haya estado restringida solamente a una región dentro de la molécula, pudo tener implicaciones sobre la replicación y/o el movimiento que le restase capacidad en el sistema analizado.

La implicación del dominio patogénico en la inducción de síntomas se ha descrito fundamentalmente para PSTVd, CEVD, TASVd (Owens *et al.,* 1996; Góra *et al.,* 1996) y no se ha establecido relación con la

replicación y movimiento en la planta. En el caso de las variantes del HSVd en cítricos, la región de la molécula involucrada en la capacidad de inducir síntomas está identificada en el dominio variable (Reanwarakorn y Semancik, 1999a; Palacio-Bielsa, 1999) y, aunque se ha informado la existencia de variabilidad en el dominio patogénico, no se ha definido la implicación específica de este en el desarrollo de una función determinada. Por lo tanto, las diferencias observadas en la replicación y movimiento en las plantas de pepino de la variante 26x-c45 respecto a la maestra (26x-c2) indican que este dominio puede estar involucrado en estas funciones. Además, el hecho de que las variaciones entre estas secuencias estuviesen ubicadas en la frontera entre el dominio patogénico y el terminal izquierdo (el cual se relaciona con tales funciones, Flores *et al.,* 2005), pudiera provocar que el dominio patogénico influyera sobre el terminal izquierdo y así inducir una disminución en la capacidad de realizar estas funciones. Estos resultados sugieren una posible implicación del dominio P en la replicación y/o movimiento del viroide en la planta, directa o indirectamente.

La detección del HSVd a los 17 días en las plantas de pepino inoculadas con las cuatro variantes analizadas, aún en aquellas en las que durante la primera semana fue imposible su detección, pudiera ser el resultado de la presencia de nuevas variantes como parte de la población establecida. Las poblaciones de viroides se establecen en sus hospedantes mediante el modelo de *cuaiespecies* guiado por la replicación mediante la ARN polimerasa II de la planta (Flores *et al.,* 2004). En la maquinaria de replicación se sintetiza una molécula de ARN cada 0.4 segundos y en cada ciclo puede generarse al menos una mutación en cada cadena de ARN (Moya *et al.,* 2000), por lo que pasado un tiempo mayor de posinoculación es muy probable que estén presentes nuevas variantes que difieren de las inoculadas inicialmente y sean más competentes para el sistema, permitiéndoles alcanzar concentraciones suficientes para ser detectadas por el método empleado. La aparición de nuevas variantes durante el establecimiento de la población se debe determinar mediante estudios de caracterización molecular.

Por otra parte, la utilización de plantas de pepino en ensayos biológicos se recomienda para la replicación del HSVd a partir de aislados de cítricos pues no es capaz de replicar a todas las especies de viroides que afectan a los cítricos. Sin embargo, no es capaz de discriminar mediante la sintomatología entre variantes de tipo CVd-IIa y CVd-IIb (Duran-Vila *et al.,* 1988). En el presente trabajo no se pudo apreciar síntomas macroscópicos en ninguna de las variantes analizadas. No obstante, sería conveniente determinar los posibles efectos citológicos, bioquímicos u otras modificaciones en la fisiología de este hospedante.

Los resultados obtenidos con el empleo de plantas de pepino como modelo para evaluar interacciones entre el ARN del HSVd y la planta, específicamente en la replicación y movimiento a larga distancia, sugirieron que las diferencias halladas en el dominio patogénico, tanto en la secuencia de nucleótidos como en la estructura secundaria predicha para ella, pudieron estar implicados en estas dos funciones. Esta asociación constituye un elemento novedoso en el estudio de las relaciones entre los dominios estructurales de los viroides y las funciones que pudieran desempeñar y son también consistentes con lo

informado por otros autores (Palacio-Bielsa, 1999; Flores *et al.,* 2005) referido a que una función determinada puede ser el resultado de la interacción de varios dominios de la molécula, y a su vez, un dominio puede estar involucrado en el desarrollo de más de una función.

5.4. La RT-PCR en variantes cítricas del HSVd permite su diferenciación según el carácter patogénico

Basados en la secuencia motivo ubicada en el dominio variable que identifica a estas variantes (Reanwarakorn y Semancik, 1999a) se diseñaron dos cebadores homólogos, cuya evaluación de los parámetros de eficiencia, según el programa informático Oligo (versión 6.31, Wojciech y Piotr Rychlik, 1989-2000), no predijo la formación de sitios de falsos apareamientos. Este es un criterio importante para que tenga lugar una PCR óptima, pues los resultados generalmente son ambiguos si existe un apareamiento de bases entre la posición 3´ del cebador y otros sitios en el molde, además de aquel al que está dirigido. La especificidad del cebador es esencial cuando las condiciones no son restrictivas y resulta significativa la formación de híbridos entre el cebador y el ácido nucleico molde con homología imperfecta (Rychlik *et al*., 1995). Los ensayos de RT-PCR a partir de los aislados de cítricos que contenían variantes CVd-IIb (causantes de cachexia) y de PCR a partir de clones portadores de secuencia de CVd-IIb y CVd-IIa (no causantes de cachexia) permitieron la identificación específica de ambos tipos de variantes.

La ejecución experimental de la PCR mostró que la pareja de cebadores donde intervino el cebador homólogo IIb manifestó una menor especificidad por lo que fue necesario ajustar las condiciones de la hibridación de este al molde de ADNc a condiciones más restrictivas donde se imposibilitase la amplificación de las variantes CVd-IIa. De esta manera, quedaron establecidas las condiciones óptimas para las dos parejas de cebadores ensayadas permitiendo la amplificación específica según fuese el caso.

Las predicciones de las estructuras secundarias formadas entre los cebadores homólogos diseñados y los ADNc moldes evidenciaron que la energía libre es un parámetro que refleja la estabilidad del sistema y brinda, además, criterios sobre la capacidad que tienen estas de formarse. Sin embargo, no sólo la energía libre puede ser un factor determinante para el desarrollo de la PCR, pues es importante también la estructura que forma el híbrido, de manera que permita un adecuado reconocimiento y promueva la actividad de polimerización de la ADN polimerasa (Rychlik, 1995). En tal sentido la iniciación a partir de los cebadores puede ser un factor crítico la pérdida de la especificidad de la reacción (Reanwarakorn y Semancik, 1999b).

La aplicación de la PCR *in silico* permitió el análisis de las secuencias del HSVd informadas en hospedantes cítricos en la base de datos que contiene a los ARN subvirales (Pelchat *et al.,* 2003) y de las cuales no existía disponibilidad en el laboratorio. Mediante el programa Oligo se pudo predecir el comportamiento de los cebadores diseñados para la diferenciación de las variantes no patogénicas, CVd-IIa, y las patogénicas, CVd-IIb. En las variantes donde se identificó secuencia motivo tipo CVd-

IIa o CVd-IIb, los valores de P.E. fueron superiores a los prefijados por el programa, lo cual predice la idoneidad de los cebadores diseñados. La P.E. considera la estabilidad del híbrido entre el cebador y el molde y su distancia a partir del extremo 3´, los lazos y uniones inespecíficas a partir del extremo 3´ y la longitud completa del cebador. Se ha determinado que se obtienen mejores resultados cuando la predicción de la formación del híbrido entre el cebador y el molde se guía por el valor de P.E., que cuando se hace por los valores de la temperatura de fusión (Tm) del cebador (Rychlik *et al.*, 1990).

Adicionalmente, aquellas variantes del HSVd en cítricos que no contenían la totalidad de los cambios descritos para las variantes CVd-IIa y CVd-IIb fueron definidas en este trabajo como intermedias. La comparación de la predicción de la PCR *in silico* en estas variantes con la caracterización biológica del aislado de donde provinieron mostró que las obtenidas a partir de aislados no causantes de cachexia sólo amplificaron con la pareja de cebadores donde estuvo presente el cebador homólogo IIa. Por su parte, en el caso de las variantes intermedias provenientes de aislados patogénicos se observó que para las secuencias HSVd.cit089 y 90, obtenidas a partir del aislado PM 26-X en el hospedante lima, se predijo la amplificación sólo mediante la pareja de cebadores que contenía al cebador homólogo IIa. Según los resultados obtenidos en este trabajo en la caracterización molecular de las poblaciones del aislado PM 26-X de cítricos en Cuba, aunque este aislado inicialmente fue caracterizado en cidro como causante de cachexia acusada, los estudios obtenidos de la población una vez que se inoculó en lima, revelaron que mediante la selección que ejerce el hospedante sobre la población este fue capaz de cambiar la composición de la misma, de manera que sólo cinco de las ocho variantes contenían los cambios específicos de CVd-IIb.

De forma general, los ensayos de RT-PCR realizados para la diferenciación de los tipos de variantes del HSVd en cítricos, causantes o no de cachexia (tipos CVd-IIb y CVd-IIa, respectivamente), mostraron que las parejas de cebadores VP19-IIa y Vp19-IIb resultaron eficientes para esta diferenciación bajo las condiciones ensayadas. Se arribó a resultados similares tanto en los ensayos de laboratorio como mediante la PCR *in silico*.

El interés de diferenciar las variantes cítricas del HSVd tiene en cuenta que mientras las variantes CVd-IIb son causantes de la cachexia de los cítricos y pueden llegar a ocasionar la muerte del árbol bajo determinadas condiciones (Pérez, 2004a), las variantes CVb-IIa pueden ser empleadas para la obtención de plantas cítricas de pequeño porte vegetativo sin causar pérdidas económicas por parcela, como una medida en el manejo de este cultivo (Reanwarakorn y Semancik, 1999b). Por lo tanto, tal discriminación puede tener una gran importancia desde el punto de vista de la práctica comercial.

La diferenciación entre variantes del HSVd causantes de cachexia de aquellas que no lo son puede ser realizada por diferentes métodos. Uno de ellos lo constituyen los estudios de caracterización que

involucran ensayos biológicos con el empleo de plantas indicadoras, las cuales responden de manera específica ante la variante CVd-IIb (Duran-Vila *et al.,* 1988). Estos ensayos consumen mucho tiempo y además, en ellos tiene lugar el fenómeno de interferencia entre CVd-IIa y CVd-IIb, mediante el cual la planta indicadora no muestra síntomas de cachexia aún cuando contiene aislados portadores de ambos tipos de variantes, lo que conduce a resultados erráticos (Pina *et al.,* 1991; Semancik *et al.,* 1992). Teniendo en cuenta que los viroides de cítricos se presentan comúnmente en sus hospedantes como poblaciones compuestas por más de una especie (Velázquez, 2004), entre las cuales pueden encontrarse variantes del HSVd patogénicas o no, el efecto limitante de la interferencia en la caracterización de aislados cobra mayor fuerza.

Desde el punto de vista de la identificación y diagnóstico el uso de sondas específicas que permitan diferenciarlos mediante un ensayo de hibridación de ácidos nucleicos puede tener inconvenientes, pues las diferencias nucleotídicas entre CVd-IIa y CVd-IIb enmarcan a un número muy reducido de bases. En este sentido en un trabajo realizado por Reanwarakorn y Semancik (1999b), se diseñó una sonda marcada con fósforo radiactivo (^{32}P) capaz de reconocer a las variantes inductoras de cachexia. Este método puede ser útil, no obstante es importante tener en cuenta las limitaciones que provoca el uso de marcadores radiactivos lo cual ha conllevado al empleo de alternativas no radiactivas (Hsu *et al.,* 2005; Han *et al.,* 2005; Chen *et al.,* 2005 ; Meyer *et al.,* 2005).

Sumado a esto, también se encuentran las dificultades que ya han sido descritas en este trabajo sobre la caracterización molecular de los aislados del HSVd en cítricos mediante ensayos biológicos, todo lo cual puede ser superado con los cebadores y condiciones de PCR establecidos en el presente estudio. Asimismo, la disponibilidad de las condiciones de PCR para la identificación tanto de las variantes del HSVd patogénicas como de aquellas que no lo son, brindan la posibilidad de tener un mayor conocimiento de la composición de variantes del HSVd presentes en una población o aislado.

Por otra parte, mediante el empleo de los ensayos *in silico* se puede inferir el comportamiento de una reacción que aún no se ha llevado a cabo en el laboratorio lo cual implica un ahorro de tiempo y costo (San Millán *et al.,* 2005). La aplicación de la PCR *in silico* permitió, en primer lugar, predecir la capacidad de amplificación específica de los cebadores diseñados para variantes del HSVd en cítricos, resultados estos que fueron consistentes en el laboratorio con un número más reducido de variantes. Además, permitió el análisis predictivo de todas las secuencias de variantes del HSVd informadas en este hospedante que se encuentran en la base de datos internacional.

Aunque el uso de los métodos *in silico* aún no constituye una herramienta de trabajo rutinaria en los laboratorios de Fitopatología, sí ha sido aplicada en otros campos, fundamentalmente en la Biomedicina. En la misma se ha empleado para integrar nuevos datos de secuencias genómicas a los mapas existentes; revelar relaciones entre marcadores que existen previamente en diferentes mapas y correlacionar distancias genéticas con distancias físicas (Schuler 1997), diseño de cebadores

degenerados y específicos para la detección y aislamiento de genes conocidos y supuestos (Regeard *et al.,* 2004), entre otros. Los resultados obtenidos mediante la PCR *in silico* en dichas líneas de investigación sustentan el valor de esta metodología y, en la medida en que su utilización se extienda hacia nuevas líneas, se convertirá cada vez más en una herramienta importante para la ejecución de nuevas investigaciones. La PCR *in silico*, como parte de las herramientas de la bioinformática que sustentan y contribuyen a una mayor integración del gran cúmulo de datos biológicos, alcanza un alto valor por las facilidades que brinda en el procesamiento de la información disponible en redes internacionales.

La aplicación de la estrategia de PCR definida en este trabajo (tanto experimental como *in silico*) puede ser una herramienta útil e importante para los estudios de caracterización de fuentes de viroides causantes de cachexia, así como para la selección de aislados que sólo contienen variantes no patogénicas en su posible uso como moléculas trasmisibles y que potencian la productividad comercial de los cítricos.

5.5. El empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio contribuye al diagnóstico rápido y eficaz del HSVd en cítricos

La detección del HSVd en plantas de pepino cv Japones inoculadas con extractos de ácidos nucleicos de plantas de cítricos que contenían a este viroide, mostró que este hospedante puede utilizarse como amplificador biológico intermedio para lograr niveles detectables mediante la hibridación de ácidos nucleicos. Las evaluaciones realizadas permitieron definir que las mejores condiciones, cuando la fuente de inóculo fueron muestras cítricas de campo, fue el muestreo de las plantas de pepino a los 14 días luego de la inoculación. En dicho momento se pudieron analizar tanto las hojas verdaderas inferior como la superior, sin que existiesen diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, aunque en estos experimentos se determinó la fortaleza de la señal de hibridación en cada caso mediante la medición de la densidad óptica, para los ensayos rutinarios es suficiente su evaluación cualitativa, ya que pudo constatarse la coincidencia entre la presencia de señal visible y la identificación de muestras positivas según los valores de densidad óptica.

La evaluación de diferentes zonas de las plantas de *C. volkameriana* Ten y Pasq. como fuente de inóculo para las plantas de pepino confirmaron la distribución irregular del HSVd en las especies cítricas, lo cual ha sido mencionado con anterioridad por Velázquez (2004), e indicaron la conveniencia de incluir muestras de la zona inferior de la planta para la conformación del inóculo y la utilización de hojas superiores de las plantas de pepino a los 14 PI para la detección del HSVd.

La no observación de síntomas en las plantas de pepino inoculadas no permitió determinar el tipo de variante que estaba presente en las muestras. Esto limita la utilidad que pudiera tener para la caracterización biológica de aislados de viroides de cítricos, sin embargo, no afecta su valor para la detección del HSVd, ya sea de las variantes CVd-IIa o CVd-IIb pues fue capaz de replicar a ambos, en lo que mostró un 100% de coincidencia con los métodos de referencia comparados. A pesar de que las variantes CVd-IIa no están asociadas a enfermedades, la estrategia que se sigue en la obtención de material de multiplicación de los cítricos es que este se encuentre libre de viroides (Pérez, 2004a). Por lo tanto, la metodología propuesta en este trabajo podría este requerimiento.

Una de las premisas fundamentales para el manejo de las enfermedades ocasionadas por viroides es la obtención y utilización de material de propagación certificado, aspecto en el cual la disponibilidad de métodos de diagnóstico eficaces juega un papel relevante. Los métodos de referencia y disponibles para el diagnóstico del HSVd requieren al menos de tres meses posinoculación para su detección mediante el análisis de los ácidos nucleicos. En cambio, los resultados obtenidos en este trabajo permitieron obtener una metodología en la cual se detecta al HSVd tan sólo a los 14 días luego de la inoculación. El alto valor de la eficacia (98.9%), similar al del método existente en la actualidad (Pérez, 2004a) evidencia su utilidad para el diagnóstico en el sistema de producción de material certificado de cítricos en Cuba.

Las evaluaciones realizadas forman parte de la primera fase de la metodología de validación de un ensayo o estrategia de diagnóstico, mediante la cual se establecen los parámetros y características de este (Jacobson, 1998). Para cumplimentar su evaluación a nivel poblacional, como proceso continuo de validación de ensayos, sería conveniente el análisis de un número mayor de controles y muestras que permitan confirmar la idoneidad de su uso en el programa de manejo y control de los viroides de los cítricos y realizar los ajustes que fueran necesarios. El empleo de la metodología que se propone para la detección del HSVd en muestras de cítricos disminuye el tiempo de toma de decisiones y el período de riesgo, aspectos de gran relevancia para los servicios especializados que garantizan la calidad fitosanitaria del material de propagación.

6. CONCLUSIONES

1. La secuenciación de ácidos nucleicos de poblaciones del HSVd en aislados cítricos cubanos permitió la identificación de 26 variantes de secuencias nuevas para esta especie y constituyen además las primeras informadas en Cuba.

2. Los análisis de las secuencias nucleotídicas de las poblaciones del HSVd del aislado patogénico PM 26-X evidenciaron el efecto de selección de la especie hospedante sobre la secuencia motivo que define el carácter de inductor o no de cachexia.

3. La tendencia en la adopción de grupos específicos en las estructuras secundarias predichas en los dominios patogénico y variable para las variantes del HSVd permitieron un agrupamiento por hospedante, lo cual sugiere una selección por parte de este.

4. El retardo en la detección de la variante 26x-c45 se relacionó a las diferencias en el dominio patogénico que presentó con respecto a la secuencia maestra, lo que sugiere la asociación de este dominio con el movimiento y/o replicación en plantas de pepino.

5. Las diferencias entre las secuencias motivos de las variantes no patogénicas (CVd-IIa) y las causantes de cachexia (CVd-IIb) permitieron establecer una estrategia de RT-PCR para su diferenciación.

6. La metodología de diagnóstico del HSVd en muestras cítricas mediante el empleo de plantas de pepino como amplificador biológico intermedio acorta el tiempo de replicación a 14 días y muestra una alta eficacia (98.9%).

7. RECOMENDACIONES

1. Continuar con el estudio de variantes del HSVd que muestren diferencias en la secuencia o estructura secundaria para profundizar en el conocimiento de su influencia sobre la expresión de la actividad biológica.

2. Utilizar el agrupamiento sugerido de las variantes de HSVd, según la conformación de la estructura secundaria, para estudios posteriores *in vitro* que permitan corroborar estas predicciones, identificar posibles sitios de interacción con elementos de la planta hospedante y función en la actividad biológica.

3. Emplear la estrategia de RT-PCR definida para diferenciar CVd-IIa y CVd-IIb en los trabajos de caracterización de fuentes de viroides.

4. Extender la metodología de diagnóstico del HSVd propuesta al análisis de un número mayor de muestras para cumplimentar su evaluación a nivel poblacional para su introducción en el sistema de material certificado de cítricos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accotto, G.P., Vaira, A.M., Noria, E. y Vecchiati, M.1998. Using non-radioactive probes on plants: a few examples. *J. Biolum. Chemilum.* 13, 295-301.

Amari, K., Gomez, G., Myrta, A., Di Terlizzi, B. y Pallás, V.2001. HSVd molecular variability. *J. Gen.Virol..* 82, 953-962.

Amexis, G.; Oeth, P.; Abel, K.; Ivshina, A.; Pelloquin, F.; Cantor, C.R.; Brau, A. y Chumakov, K.2001. Quantitative mutant analysis of viral quasispecies by chip-based matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 98(21):12097-12102.

Astruc, N, Marcos, J.F., Macquaire, G., Candresse, T. y Pallás, V.1996. Studies on the diagnosis of hop stunt viroid in fruit trees: Identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *Eur. J. Plant Path.* 102, 837-846.

Branch, A. D., Benenfeld, B. J. y Robertson, H. D.1988. Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 9128-9132.

Bussiere, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczowski, L.J. y Perreault, J,P.1999. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks og group A viroids, *J. Virol.* 73, 6353-6360.

Butcher, S. E. y Burke, J.M.1994. A photo-cross-linkable tertiary structure motif found in functionally distinct RNA molecules is essential for catalytic function of the hairpin ribozime. *Boichemistry* 33, 992-999.

Candresse, T., Hammond, R. y Hadidi, A.1997. PCR detection of viruses and viroids. En: *Control of Plant Virus Diseases*, Eds Khetarpal, R.K., Koganezawa, H., Hadidi, APS press. St Paul, MN USA.

Candresse, T.; Gora-Sochacka, A. y Zagorski, W. 2001. Restoration of secondary hairpin II is associated with restoration of infectiity of a non-viable recombinant viroid. *Virus Res.* 75(1): 29-34.

CENSA*soft*. 1998. Paquete estadístico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), La Habana, Cuba.

Chen, W.J.; Tsai, K.H.; Cheng, S.L.; Huang, C.G. y Wu, W.J. 2005. Using in situ hybridization to detect endosymbiont Wolbachia in dissected tissues of mosquito host. *J Med Entomol*, 42(2):120-4.

Chen, X., Baumstark, T., Steger, G. y Riesner, D. 1995. High resolution SSCP by optimization in the temperature by transverse TGGE. *Nucleic Acids Res.* 23, 4524-4525.

Chils, J.F.L. 1950. The cachexia disease of Orlando tangelo. *Plant Dis. Rep.* 34, 295-298.

da Graca,J.V. y Martín M.M.1981.Ultrstructural changes in avocado leaf tissue infected with avocado sunblotch.P*hytopathol.Z.*102,185-194.

De Box, J.A. y Piron, P.G.M.1981. Transmission of potato spindle tuber viroid by aphids. *Neth. J. Plant Pathol.* 87, 31-34.

De la Pena, M. y Floes, R. 2001. An extr nucleotide in the consensus catalytic core of a viroid hammerhead ribozyme: implications for desing of more efficient ribozymes. *J Biol Chem,* 276(37):34586-34593.

Denti, M.A.; Boutla, A.B.; Tsagris, M. y Tabler, M. 2004. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroide are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *The Plant Journal*, doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02001.x.

Di Serio, F., Aparicio, F., Alioto, D., Ragozzino, A. y Flores, R. 1996. Identification and molecular properties of a 306 nucleotide viroid associated with apple dimple fruti disease. *J. gen. Virol.* 77: 2833-2837.

Diener, T. O.1986. Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 58-62.

Diener, T.O. 1999. Viroids and the nature of viroid diseases. *Arch. Virol.* 15, 203-220.

Diener, T.O., Owens, R.A. y Hammond, R.W. 1993. Viroids: The Smallest and Simples Agents of Infectious Disease. How Do They Make Plants Sick? *Intervirology* 35,186-195.

Diener, T.O.1987. Biological properties. En: *The viroids*. Diener, T.O. (Ed.) Plenim Press, New York. p 9-35.

Dijkstra, J. y de Jager, C.P. 1998. *Practical Plant Pathology: Protocols and Exercises.* Springer-Verlag, Berlin.

Ding, X.S., Flasinski, S. y Nelson, R.S. 1999. Infection of barley by brome mosaic virus is restricted predominantly to cells in and associated with veins through a temperature-dependent mechanism. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 12, 615-623.

Domingo, E.; Ruiz-Jarabo, C.M.; Sierra, S.; Arias, A.; Pariente, N.; Baranowski, E. y Escarmis, C. 2002. Emergence and selection of RNA virus variants: memory and extinction. *Virus Res,* 30;82(1-2):39-44.

Duran-Vila, N. y Semancik, J.S. 1990. Variations in the "cross protection" effect between two strains of citrus exocortis viroid. *Ann. Appl. Biol* 117, 367-377.

Durán-Vila, N., Pina, J.A. y Navarro, L. 1993. Improved Indexing of Citrus Viroids, p. 202-210. En: *Proc. 12th Conf. IOCV.* IOCV, Riverside, USA.

Duran-Vila, N.; Roistacher, C. N.; Rivera-Bustamante, R. y Semancik, J. S.1988. A definition of viroid groups and their relationship to the exocortis disease. *J. gen. Virol,* 69, 3069-3080.

Eigen, M. 1993. The origin of genetic information: Virus as models. *Gene,* 135:37-47.

Enomoto, N., Kurosaki, M., Tanaka, Y., Marumo, F. y Sato, C. 1994. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistentinfection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis *J. Gen. Virol.* 75, 1361-1369.

Fadda, Z; Daros, J.A.; Flores, R. y Duran-Vila, N. 2003. Identification in eggplant of a variant of citrus exocortis viroid (CEVd) with a 96 nucleotide duplication in the right terminal region of the rod-like secondary structure. *Virus REs.* 97(2):145-149.

Fagoaga, C.; Semancik, J. S. y Duran-Vila, N. 1995. A citrus exocortis viroid variant from broad bean (*Vicia faba* L.): infectivity and pathogenesis. J. gen. Virol., 76, 2271-2277.

Fels, A.; Hu, K. y Riesner, D. 2001. Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts predominantly ay two specific sites. *Nucleic Acids Res.,* 29(22): 4589-4597.

Filipovska, J. y Konarska, M.M. 2000. Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in Vitro. *RNA,* 6(1):41-54.

Flores, R. 2001. A naked plant-specific RNA ten-fold smaller than the smallestknown viral RNA: the viroide. *C R AcadSci III,* 324(10):943-952.

Flores, R.; Delgado, S.; Gas, M.E.; Carbonel, A.; Molina, D.; Gago, S. y De la Peña M.2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. FEBS Letters, 567, 42-48.

Flores, R.; Di Serio, F. y Hernández, C. 1997. Viroids: The non coding genomes. *Semin. Virol*. 8:65-73.

Flores, R.; Hernández, C.; Martínez de Alba, A.E.; Darós, J.A. y Di Serio, F. 2005. Viroids and viroids host interactions. *Annual Review pf Phytopathology*, 43:117-139.

Flores, R.; Randles, J.W.; Bar-Joseph, M. y Diener, T.O.1998. A proposed scheme for viroid classification and nomenclature. *Arch.Virol.*, 143 (3):623-629.

Foissac, X. y Duran-Vila, N. 2000. Characterization of two citrus apscaviroids isolated in Spain. *Arch Virol.,* 145(9):1975-1983.

Forster, A. C., y Symons, R. H.1987. Self-cleavage of plus and minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell (Camb.)* 49, 211-220.

Gast, F.V., Kempe, D., Spieker, R.L. y Sänger, H.L.1996. Secundary structure probing of potato spindle tuber viroid (PSTVd) and saquence comparison with other small pathogenic RNA replicons provides evidence central non-canonical base-pairs, large A-rich loops and a terminal branch. *J.Mol. Biol.* 263, 652-670.

González, L.; Soto, M.; Ortiz, M.I. y Peralta, E.L. 2001. Determinación de parámetros analíticos de las técicas de hibridación de ácidos nucleicos para la detección del virote del tubérculo ahusado de la papa (PSTVd). *Fitopatología,* 36(1):24-33.

Góra, A ., Candresse, T. y Zagórski, W. 1996. Use of intramolecular cimeras to map molecular determinants of symptom severity of potato spindle tuber viroid (PSTVd).*Arch. Virol.* 141, 2051-2055.

Gruner, R., Fels, A., Qu, F., Zimmat, R., Steger, G. y Riesner, D. 1995. Interdependence of pathogenicity and replicability with potato spindle tuber viroid. *Virology* 209, 60-69.

Gultyaev, A.P.; Van Batenburg, F.H.D. y Pleij, C.W.A. 1998. Dynamic competition between alternative atructures in viroide RNAs simulated by an RNA folding algorithm. *J. Mol. Biol.,* 276(1):43-55.

Hadidi, A., levy, L. y Podleckis, E. V.1995. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. En: Molecular Methods in Plant Pathology. Ed.: R.P. Singh y U.S. Singh, CRC, Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp 165-187.

Hammond, R.W: y Zhao, Y. 2000. Characterization of a tomato protein kinase gene induced by infection by potato spindle tuber viroid. *Mol Plant Mocrobe Interact.,* 13(9):903-910.

Han, C.M.; He, X.J. y Ma, Q. 2005. The expression of tenascin-C mRNA in keloids and hypertrophic scars. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi,* (1):40-43.

Harper, K., Toth, R.L., Mayo, M. A. y Torrance, L.1999. Properties of a panel of single chain variable fragments against potato leafroll virus obtained from two phage display libraries. *J. Virol. Methods* 81, 159-168.

Hiddinga, H.J., Crum, C.J., Hu, J. y Roth, D.A.1988. Viroid-induced phosphorylation of a host protein related to a dsRNA-dependent protein Kinase. *Science* 241, 451-453.

Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J. y Weghorst, C.M. 1993. "Cold SSCP": a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res.* 21, 3637-3642.

Hsu, Y.; Chen, W. y Owens, R.A.1994. Nucleotide sequence of a hop stunt viroid variant isolated from citrus growing in Taiwan. *Virus Genes*, 9, 193-195.

Hsu, Y.C.; Yeh, T.J. y Chang, Y.C. 2005. A new combination of RT-PCR and reverse dot blot hybridization for rapid detection and identification of potyviruses. *J Virol Methods.* May 7; (para imprimir).

Hull, R.2002. Plant Virology*,* ed Academic Press, pp, 593-671.

Igloi, G.L. 1983. Silver stain for the detection of nanogram amounts of tRNA following two-dimensional electrophoresis. *Anal. Biochem*., 134:184-188.

Itaya, A.; Matsuda, Y.; González, R.A.; Nelson, R.S. y Ding, B. 2002. Potato spindle tuber viroid strains of different pathogenicity induces and supresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol Plant Mocrobe Interact.,* 15(10):990-999.

Ito, T.; Ieki, H.; Ozaki, K. and Ito, T. 2001. Characterization of a new citrus viroid species tentatively named citrus viroid OS. *Arch Virol*. 146(5):975-82.

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. *Phytopathol*. 92, 542-547.

Jacobson, R.H. 1998. Validación de pruebas sexológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.,* 17(2), 507-526.

Jukes, T.H., y Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules *In "Mammalian Protein Metabolism"* (H.N. Munro, Ed.), pp21-132 Academic Press, New York.

Kamp, C. y Bornholdt, S. 2002. Coevolution of quasispecies: B-cell mutation rates maximize viral error catastrophes. *Phys Rev Lett,* 88(6):068104.

Kesse, P. y Symons, R. H.1987.Physical-chemical properties. Molecular structure (primary and secondary). in *The Viroids,* Diener, T.O., De., Plenum Press, New York, chap 2.

Kesse, P. y Symons, R.H.1985. Domains in viroids: evidence of intermolecular ARN rearrangement and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82, 4582-4586.

Knapps, E., da Cámara Machado, A. y Pühringer. H.1995. Localization of fruti tree viruses by inmune-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. *J.Virol. Methods* 55, 157-173.

Kofalvi, S.A.; Marcos, J.F.; Cañizares, M.C.; Pallás, V. y Candresse, T.1997. Hop stunt viroid (HSVd) sequence variants from *Prunus* species: Evidence for recombination between HSVd isolates. *J. Gen. Virol.* 78, 3177-3186.

Koonjul, P. K., Brandt, W. F. , Farrant, J. M. y Lindsey, G.G.1999. Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase cahin reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucleic Acids Res*. 27, 915-916.

Lakshman, D.K. y Tavantzis, S.M.1993. Primary and secundary structure of a 306-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid. *Arch. Virol.* 128, 319-331.

Liu, Y.H. y Symons, R.H.1998. Specific RNA self-cleavaje in coconut cadang cadang viroid: potential for a role in rolling circle replication. *RNA* 4, 418-429.

Maniataki, E.; Martínez de Alba, A.E.; Gesser, R.S.; Tabler, M. y Tsagris, M. 2003. Viroid RNA systemic spread may dependo on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin wuith the host proein VirP1. *RNA,* 9(3):346-354.

Martínez de Alba, A.E.; Sájese, R.; Tabler, M. y Tsagris, M. 2003. A bromodomain-containing protein from tomato specifically binds potato spindle tuber viroid RNA in Vitro and in vivo. *J. Virol.,* 77(17): 9685-9694.

Matousek, J.; Patzak, J.; Orctova, L.; Schubert, J.; Vrba, L.; Steger, G. y Riesner, D. 2001. The variability of hop laten viroid as induced upon heat treatment. *Virology,* 287(2): 349-358.

Matzke, M.A.; Mette, M.F y Matzke, J.M. 2000. Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Molecular Biol.,* 43:401-415.

Meyer, G.R.; Bower, S.M. y Carnegie, R.B. 2005. Sensitivity of a digoxigenin-labelled DNA probe in detecting Mikrocytos mackini, causative agent of Denman Island disease (mikrocytosis), in oysters. *J Invertebr Pathol*, 88(2):89-94.

Moya, A.; Elena, S.F.; Bracho, A.; Millares, R. y Barrio, E.2000. The evolution of RNA viruses: a population genetic view, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87 (13), 6967-6973.

Mumford, R. A., Walsh, K., Barker, I. y Boonham, N.2000. Detection of Potato mop top virus and Tobacco rattle virus using a multiplex real-time fluorescent reverse-transcription polymerase assay. *Phytopathology* 90 (5), 248-253.

Muro-Cacho, C.A. 1999. *In situ* polymerase chain reaction: overview of procedures and application. *Pediatr. Pathol. Mol. Med.* 18, 231-253.

Navarro, J.A. y Flores, R.2000. Characterization of the initiation sites of both polarity strads of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *EMBO J.* 19, 2662-2670.

Navarro, J.A., Daros, J.A. y Flores, R.1999. Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* 253, 77-85.

Navarro, J.A., Vera, A. y Flores, R.2000. A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of Avocado sunblotch viroid. *Virology* 268, 218-225.

Nie, X. y Singh, R.P.2000. Detection of multiple potato viruses using an oligo (dT) as common cDNA primer in multiplex RT-PCR. *J. Virol. Methods,* 86 (2), 179-185.

Nie, X. y Singh, R.P. 2001. A novel usage of random primers for multiplex RT-PCR detection of virus and viroid in aphids, leaves and tubers. *J. Virol.. Methods,* 91(1):37-49.

Owens, R.A., Steger, G., Hu, Y., Fels, A., Hammond, R.W. y Riesner, D. 1996. RNA structural features responsible for potato spindle tuber viroid pathogenicity. *Virology* 22, 144-158.

Owens, R.A.; Blackburn, M. y Ding, B. 2001. Possible involment of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant Microbe Interact.,* 14(7):905-909.

Owens, R.A.; Thompson, S.M. y Kramer, M. 2003. Identification of neutral mutants surrounding two naturally occurring variants of Potato spindle tuber viroid. *J Gen Virol.* 84(3):751-6.

Owens, R.A.; Yang, G.; Gunderse-Rindal, D.; Hammond, R.W.; Candresse, T. y Bar-Joseph, M. 2000. Both point mutation and RNA recombination contribute to the sequence diversity of citrus viroide III. *Virus Genes.,* 20(3):243-252.

Palacio.Bilesa, A. y Duran-Vila, N.2000. Citrus cachexia disease: molecular characterization of its viroid agent. *Fourteenth IOCV Conference.*

Palacio-Bielsa, A. 1999. La exocortis y la cachexia de los cítricos: mejora de los métodos de detección y caracterización. Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad de Valencia, España.

Palacio-Bielsa, A., Foissac, X. y Duran-Vila, N.1999. Indexing of citrus viroids by imprint hybridization. *Eur. J. Plant Pathol.* 105, 897-903.

Palacio-Bielsa, A.; Romero-Durban, J. y Duran-Vila, N. 2004. Characterization of citrus HSVd isolates. *Arch. Virol.*149(3): 537-552.

Pallás, V. y Flores, R.1989. Interactions between Citrus Exocortis and Potato Spindle Tuber Viroids in Plants of *Gynura aurantiaca* and *Lycopersicon esculentum. Intervirology* 30, 10-17.

Papaefthimiou, I.; Hamilton, A.J.; Denti, M.A.; Baulcombe, D.C.; Tsagris, M. y Tabler, M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroide RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research*, 29(11): 2395-2400.

Pelchat, M; Rocheleau, L; Perreault, J. and Perreault, J.P. 2003. SubViral RNA: a database of the smallest known auto-replicable RNA species. *Nucleic Acids Res.* 31(1):444-5.

Peña, I.; Pérez, J.M.; Batista, L.; Velázquez, K. y Alonso, M. 2004. Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. En *Curso taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos.* Ed. Fondo fiduciario Pérez Guerrero, Cuba.

Peralta, E.L. y Villoch, A. 1999. Metodología para la validación de ensayos inmunoquímicos y moleculares utilizados en el diagnóstico de fitopatógenos. Abstract. En *X Congreso Latinoamericano de Fitopatógenos*. Guadalajara, México, No. 153.

Pérez, R. 2004a. Optimización del diagnóstico biológico del viroide de la cachexia de los cítricos. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas, Ministerio de la Agricultura, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Pérez, R. 2004b. Enfermedades ocasionadas por viroides en la citricultura. En *Curso taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos.* Ed. Fondo fiduciario Pérez Guerrero, Cuba.

Pérez, R.; González, A.; Bello, L. y Marrero, A. 1992. Clemelin 11-20: a new indicador plant for citrus cachexia. *Proc. 7th Intern. Citrus Cong*. 2: 786-787, Italia.

Pina, J.A., Duran-Vila, N. y Navarro, L. 1991. Interference of citrus viroids with cachexia symptoms on Parson's Special mandarin. En: *Proc. 11th Conf. Int. Organ. of Citrus Virol.* Brlansky, R.H., Lee, R.F., Timmer, L.W. (Eds.). IOCV, Riverside, California. p 206-208.

Pincel, S.; Weyer, S.; Galle, P.R. y Lohr; H.F. 2002. Evolution of viral quasispecies in four dominant HlA-A2 restricted T cell epitopes is not a major reason for viral persistence in interferon-treated patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol,* 66(4):472-480.

Polivka, H., Staub, U.y Gross, H.J. 1996. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: Novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations on hairpin I. *J. Gen. Virol.* 77, 155-161.

Qi, Y. y Ding, B. 2003. Replication of potato spindle tuber viroide in cultured cells of tobacco and Nicotiana benthamiana: the role of specific nucleotides in determining replication levels for host adaptation. *Virology,* 302(2).445-456.

Qi, Y.; Pellisier, T.; Itaya, A.; Hunt, E.; Wassenegger, M. y Ding, B. 2004. Direct role of a viroid RNA motif in mediating directional RNA trafficking across a specific cellular boundary. *Plant Cell.*, 16(7):1741-1752.

Querci, M.; Owens, R.; bartoli, I.; Lazarte, V. y Zalazar, L. 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of Gen. Virol.* 78: 1207-1211.

Querci, M.; Owens, R.A.; Vargsa, C. y Zalazar, L.F. 1995. Detection of potato spindle tuber viroid in avocado growing in Peru. *Plant Dis.*, 79: 196-202.

Rakowski, A.G.y Symons, R.H.1994. Infectivity of linear monomeric transcripts of citrus exocortis viroids: Terminal sequences requeriments for processing. *Virology* 203, 328-335.

Ranki, M., Palva, A.,Virtanen, M., Laaksonen, M. y Soderlund, H.1983. Sandwich hybridization as a convenient method for detection of nucleic acids in crude samples. *Gene* 21, 77-85.

Reanwarakorn, K. y Semancik, J.1998. Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. of Gen. Virol.,* 79: 3163-3171.

Reanwarakorn, K. y Semancik, J. 1999a. Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology,* 89 (7): 568-574.

Reanwarakorn, K. y Semancik, J. 1999b. Discrimination of cachexia disease agents among citrus variants of hop stunt viroid. *Ann. Appl. Biol.,* 135: 481-487.

Regeard, C.; Maillard, J. y Holliger, C. 2004. Development of degenerate and specific PCR primers for the detection and isolation of known and putative chloroethene reductive dehalogenase genes. *J Microbiol Methods,* 56(1):107-18.

Rezaian, M.A. 1990. Australian grapevine viroid evidence for extensive recombination between viroids. *Nucleic Acids Res.* 8, 1813-1818.

Ridgen, J.E., Rezaian, M.A. 1992. *In vitro* syntesis of an infectious viroid: Analysis of the infectivity of monomeric linear CEVd. *Virology* 186, 201-206.

Rocha-Peña, M.; Lee, R.F.; Lastra, R.;iblett, C.L.; Ochoa-Corona, F.; Garnsey, S.M. y Yokomi, R. 1995. Citrus Tristeza Virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. Threats to citrus production in the Central and North America. *Plant Disease*, 79(5):437-445.

Romero-Durbán, J., Cambra, M. y Duran-Vila, N.1995. A simple imprint-hibridization method for detection of viroids. *J. Virol. Methods* 55, 37-47.

Rotmistrovsky, K.; Wonhee, J. y Schuler, D. 2004. A web server for performing electronic PCR. *Nucleic Acids Research*, 32, web server Issue, DOI: 10.1093/nargl/gkh 450.

Rubio, L., Ayllón, M.A., Guerri, J., Pappu, H., Niblett, C. y Moreno, P. 1996. Differentiation of citrus tristeza closterovirus (CTV) isolates by single-strand conformation polymorfism analysis of the coat protein gene. *Ann. Appl. Biol.* 129, 479-489.

Ruiz-Jarabo, C.M.; Arias, A.; Molina-Paris, C.; Briones, C.; Baranowski, E.; Escarmis, C. y Domingo, E. 2002. Duration and fitness dependence of quasispecies memory. *J Mol Biol,* 315(3):285-296.

Rychlik W., Spencer, W.J., and Rhoads, R.E. 1990. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res.* 18, 6409-6412.

Rychlik, W. 1995. Selection of primers for polymerase chain reaction. 1995. *Molecular Biotechnology*, 3: 129-134.

Saitou, N.M., y Nei, M.1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4, 406-425.

Salazar, L. F. 1989. Potato spindle tuber viroid. Cap. 11, En: Plant protection and quarantine, Vol. II. Ed.: R.P. kahn, CEC Press Inc., Boca Ratón, Florida, U.S.A. pp 155-167.

Salazar, L. F. 1995. Los virus de la papa y su control. Ed.: Centro internacional de papa, Lima, Perú. 226 págs.

Salazar, L. F.1996. Los virus de la papa y su control. Ed. *Centro Internacional de la Papa*. Cap 7, 149-175.

Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T.1989: *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 2da Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. U.S.A.

San Millán, R.; Garaizar, J. y Bikandi, J. 2005. *In silico* simulation of fingerprinting techniques based on double endonuclease digestion of genomic DNA. *In Silico Biology* 5, 0031, Bioinformation Systems e.V.

Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., y Owens, R.A.1992. Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89,1014.1018.

Sano, T.; Minura, R. y Ohshima, K. 2001. Phylogenetic análisis of hop and grapevine isolates if hop stunt viroid supports a grapevine origen for hop stunt disease. *Virus Genes.,* 22(1):53-59.

Sano,T. y Ishiguro, A. 1998. Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid cimeras suggest posible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* 240, 238-244.

Sarrazin, C.; Bruckner, M.; Herrmann, E.; Ruster, B.; Bruch, K.; Roth, W.K. y Zeuzem, S. 2001. Quasispecies heterogeneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. *Virology,* 289(1):150-163.

SAS. 2001. Statistical Analysis System, version 8.02, SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.

Schnell, R.J.; Olano, C.T. y Kuhn, D.N. 2001. Detection of avocado sunblotch viroide variants using fluorescent single-strand conformation polymorphism analysis. *Electrophoresis,* 22(3):427-432.

Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann, H., y Sänger, H. L.1985. Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd). *ENBO J.* 4, 2181-2190.

Schrader, O.; Baumstark, T. y Riesner, D. 2003. A mini-RNA containing the tetraloop, wobble-pair and loop E motifs of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is processed into a minicircle. *Nucleic Acids Res.,* 31(3):988-998.

Schroder, A.R. y Riesner, D. 2002. Detection and analysis of hairpin II, an essential metstable structural element in viroide replication intermediates. *Nucleic Acids Res.,* 30(15):3349-3359.

Schuler, G.D. 1997. Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res*., 7(5):541-50.

Semancik, J. S.; Gumpf, D. J. y Basch, J. A. 1992. Interference between viroids inducing exocortis and cachexia disease of citrus. *Ann. Appl. Biol.,* 121: 577-583.

Semancik, J. S.; Morris, T. J.;, Weathers, L. G.; Rordorf, G. F. y Kears, D. R.1975. Physical properties of a minimal infectious RNA (viroid) associated with the exocortis disease. *Virology,* 63: 160-167.

Semancik, J.S. y Duran-Vila, N. 1999. Viroids in plants: Shadows and fooprints of a primitive RNA. En: *Origin and evolution of viruses.* Domingo, E.; Webster, R.G, y Holland, J.J. (eds). Academic Press, London. P37-64.

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. *J. Horticultural Sci.* 72, 563-570.

Semancik, J.S., Roistacher, C.N., Rivera-Bustamante, R.y Duran-Vila, N.1988. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: Relationship to viroids of the exocortis disease complex. *J. Gen. Virol.* 69, 3059-3068.

Semancik, J.S.1999. Corelation of variants of hop stunt viroid with cachexia and xiloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89.

Shamould, A.M.; Faggioli, F.; Keith, J.M. y Hadidi, A. 2002. A novel multiplex RT-PCR probe cpture hybridization (RT-PCR-ELISA) for simultaneous detection of six viroids in four genera: apscaviroid, hostuviroid, pelamoviroid and pospiviroid. *J. Virol. Mehods,* 105(1):115-121.

Shikata, E.1990. New viroids from Japan. *Virology* 1, 107-115.

Singh, R., P. y Singh, U., S.1995. Molecular Methods in Plant Pathology, Ed., *Lewis publishers*, Cap.10, pp, 133-144.

Singh, R.P. y Dhar, A.K. 1998. Detection and management of plant viroids. Cap. 32, En: *Plant virus disease control*, Ed.: A. Hadidi, R.K. Khetarpal y H. Koganezawa, American Phytopatological Society, Minnesota, U.S.A. pp 428-447.

Singh, R.P.1998. Viroids twenty-five years later: Personal reflections. En: *Topics in tropical virology*, 132-152, Eds: Donald N. Black, Dharma D. Shukla and Narayan Rishi, Malhotra publishing house, New Delhi 110 018, India.

Skoric, D.; Conerly, M.; Szychowski, J.A. y Semancik, J.S. 2001. CEVd-induced symptom modification as a response to a host-specific temperature sensitive reaction. *Virology,* 280(1):115-123.

Spence, N. y Barbara, D. 2000. Viroids and other sub-viral pathogens of plants: the samallest living fossils?. *Microbiology today,* 27, 168-70.

Symons, R.H. y Randles, J.W.1999. Encapsidated circular viroid-like satellite RNAs (virusoids) of plants. In: P.K. Votg and A.O. Jackson (eds) *Satellites and Defective RNAs,* pp. 81-105. Springer, Berlin.

Symons, R.H.1997. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucl. Acids Res.* 25, 2683-2689.

Tabler, M. y Tsagris, M.2004. Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *TRENDS in Plant Science*, 9(7): 339-348.

Tamura, K. y Kumar, S. 2002. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages Molecular Biology and Evolution 19:1727-1736.

Tessitori, M.; La Rosa, R.; Abanase, G. Y Catara, A. 1996. PCR diagnosis of citrus viroids in field samples. En: *Proc 13th Conf IOCV,* da Graca, J.V.; Moreno, P. y Yokomi, R.K. (eds). Riverside. California. P.230-235.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680.

Timmermann, C.; Muhlbach, H.P.; Bandte, M. y Buttner, C. 2001. Control of mechanical viroide transmission by the disinfection of tables and tools. *Biol wet. 66(2a):151-156.*

Velázquez, K. 2004. Caracterización biológica y molecular de viroides de cítricos de Cuba. Perfeccionamiento de su diagnóstico. Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas, Ministerio de la Agricultura, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical (IIFT).

Velázquez, K.; Pérez, J.M.; Pérez, R.; Rodríguez, D.; Peña, I.; Batista, L.;. y Duran-Vila, N. 2003b. Caracterización biológica y molecular de aislados de viroides de cítricos de Cuba. *Citrifrut,* 20(1,2 y3), 11-16.

Velázquez, K.; Soto, M.; Pérez, R.; Pérez, J.M.; Rodríguez, D. y Duran-Vila, N. 2002. Biological and molecular characterization of two isolates of citrus viroids recovered from Cuban plantations. En *fifteenth IOCV C onference,* pag 258-263, Chipre 2002.

Wah, Y.F.W.C. y Symons, R.H.1999. Transmission of viroids via grape seeds. *J. Phytopathol.* 147, 285-291.

Wang, M.B.; Bian, X.Y.; Wu, L.M.; Liu, L.X.; Smith, N.A.; Isenegger, D.; Wu, R.M.; Masuta, Ch.; Vance, V.B.; Watson, J.M.; Rezaian, A.; Dennis, E.S. y Waterhouse, M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *PNAS*, 101(9):3275-3280.

Warrilow , D. y Symons, R.H. 1999. Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato *in vivo*. *Arch. Virol* 144, 2367-2375.

Wojciech y Piotr Rychlik, .1989-2000. Primer Análisis Software, version 6.31. Molecular Biology, Insights. Inc., USA.

Woo, Y.-M., Itaya, A., Owens, R.A. *et al.*1999. Characterization of nuclear import of potato spindle tuber viroid RNA in permeabilized protoplasts. *Plant J.* 17, 627-635.

Yap, E.P.H., Lo, Y-M.D., Cooper, K. y Fleming, K.A., Mc Gee, J.O.D.1992. Exclusion of false-positive PCR viral diagnosis by single-strand conformation polymorphism. *The Lancet* 340, 736.

Zhao, Y., Owens, R.A. y Hammond, R.W.2001. Use og the vector based on potato virus X in a whole plant assay to demonstrate nuclear targeting of potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Virol.* 82, 1491-1497.

Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.-M., Owens, R. y Ding, B.2002. Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279, 69-77.

Zuker, M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3406-3415.

Zuker, M.; Mathews, D.H. y Turner D.H.1999. Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: a practical guide. En: *RNA biochemistry and biotechnology,* 11-43, J. Barciszewski y B.F.C. Clark, eds., NATO ASISeries, Kluwer Academic Publishers.

Tabla 1. Clasificación de los viroides (Flores *et al.,* 1998)[1].

Familia	Subfamilia	Género	Especie	
			Acrónimo	Nombre
Pospiviroidae	**Pospiviroinae**	**Pospiviroides**	**PSTVd**	Viroide del tubérculo ahusado de la papa
			CEVd	Viroide la exocortis de los cítricos
			CLVd	Viroide latente de *Columnea*
			IRVd	Viroide de Iresine
			MPVd	Viroide de la papita mexicana
			CSVd	Viroide del enanismo del crisantemo
			TASVd	Viroide del enanismo apical del tomate
			TCDVd	Viroide del enanismo clorótico del tomate
			TPMVd	Viroide de la planta macho del tomate
		Hostuviroides	**HSVd**	Viroide del enanismo del lúpulo
		Cocadviroides	**CCCVd**	Viroide del cadang-cadang del cocotero
			CVdIV	Viroide IV de los cítricos
			CTiVd	Viroide del tinangaja del cocotero
			HLVd	Viroide latente del lúpulo

[1] Actualizada por la base de datos Pelchat *et al.* (2003). Las especies tipo de cada género se muestran en negritas. Los acrónimos se corresponden con las siglas del nombre en inglés.

Tabla 1. Clasificación de los viroides (Flores *et al.,* 1998)[1]. *(Continuación).*

Familia	Subfamilia	Género	Especie	
			Acrónimo	Nombre de la especie
Pospiviroidae	**Apscaviroinae**	**Apscaviroides**	**ASSVd**	Viroide de la piel cicatrizada de la manzana
			ADFVd	Viroide del fruto picado del manzano
			ACJVd	Apple/Citrus junos fruit viroid
			AGVd	Viroide australiano de la vid
			CBLVd	Viroide de la hoja curvada de los cítricos
			CVd-LSS	Viroide I-LSS de los cítricos
			CVd-III	Viroide III de los cítricos
			CVd-OS	Viroide OS de los cítricos
			GYSVd-1	Viroide 1del moteado amarillo de la vid
			GYSVd-2	Viroide 2del moteado amarillo de la vid
			PBCVd	Viroide de los chancros pustulosos del peral
	Coleoviroinae	**Coleoviroides**	**CbVd**	Viroide del *Coleus blumei*
			CbVd-1	Viroide 1 del *Coleus blumei* (Viroide del amarilleamiento del cóleo)
			CbVd-2	Viroide 2 del *Coleus blumei* (Viroide

				del amarilleamiento del cóleo)
			CbVd-3	Viroide 3 del *Coleus blumei*
Avsunviroidae		**Avsunviroides**	**ASBVd**	Viroide del manchado solar del aguacate
		Pelamoviroides	**PLMVd**	Viroide del mosaico latente del melocotonero
			CChMVd	Viroide del moteado clorótico del crisantemo
		Eglatviroides	**ELVd**	Viroide latente de la berenjena

[1] Actualizada por la base de datos Pelchat *et al.* (2003). Las especies tipo de cada género se muestran en negritas.

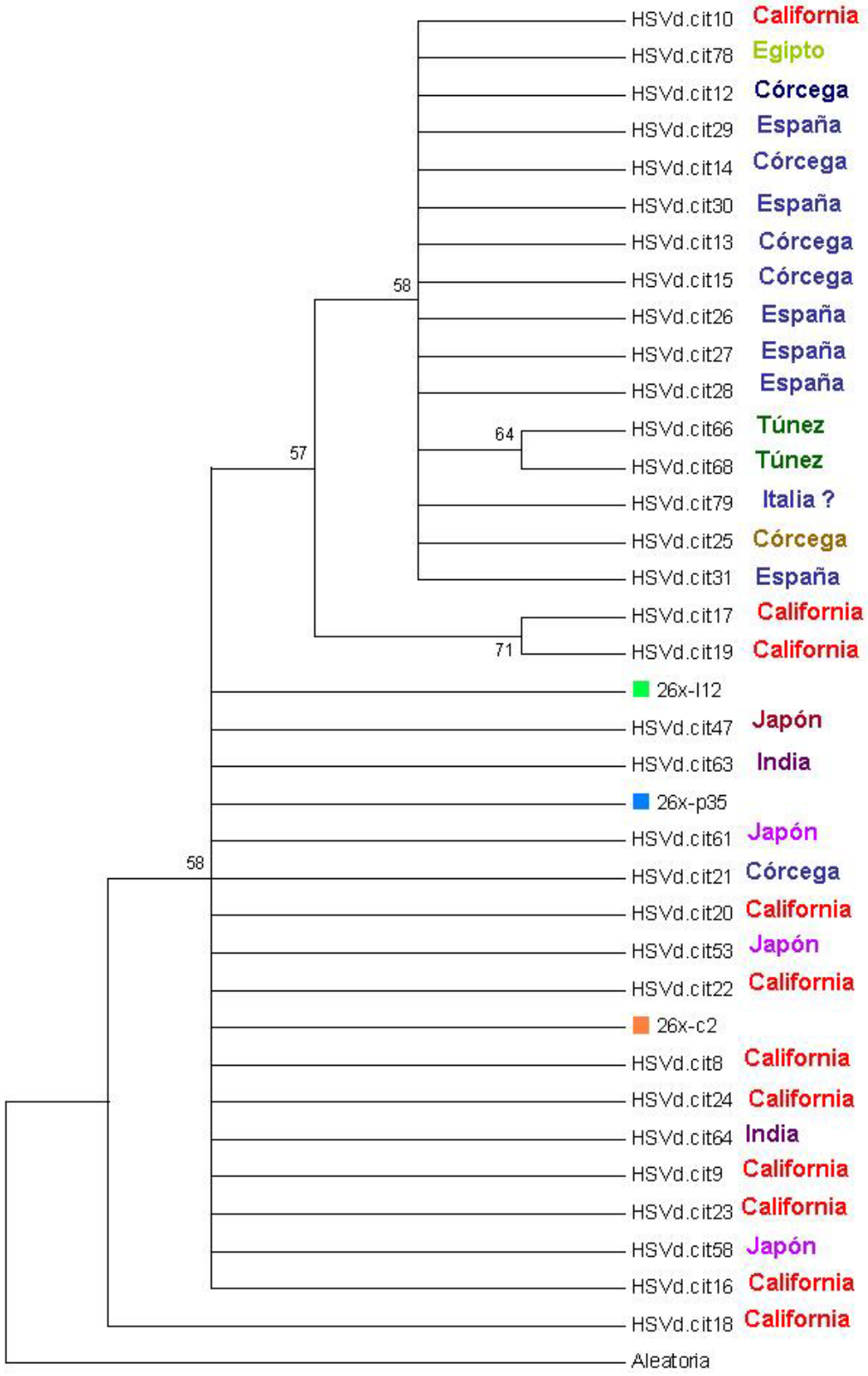


Figura 10. Árbol filogenético generado con las secuencias maestras de HSVd identificadas en el aislado cubano PM 26-X a partir de tres hospedantes y las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) en las cuales se identificó la presencia de la secuencia motivo en el dominio variable característica de las variantes CVd-IIb. En naranja, secuencia maestra en el hospedante cidro; en verde, en lima; en azul, en pepino. Como secuencia aleatoria se utilizó una variante del viroide de la mancha solar del aguacate (ASBVd.04). El alineamiento múltiple y el árbol filogenético se realizaron con los programas CLUSTAL X y MEGA. Los valores del análisis de re-muestreo se señalan expresados en porcentajes en cada nodo (1500 repeticiones).

Tabla 12. Diferencias entre las variantes de secuencia en el aislado PM 26-X obtenidas a partir de tres hospedantes diferentes.

Variante de secuencia	Dominio T_L cadena superior					Dominio P cadena superior				Dominio C cadena superior		Dominio V cadena superior				
Cidro **/nt**	**10**	**26**	**27**	**28**	**32**	**50**	**51**	**52**	**57**	**87**	**98**	**108**	**110**	**116**	**118**	**119**
26x-c2	U	A	**-**	G	A	G	C	C	-	A	A	-	G	-	G	A
26x-c18	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**.**	.	.	.	.	.
26x-c13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c29	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c45	.	.	.	.	**G**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**.**
26x-c22	**A**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**.**	.	.	.	.
26x-c26	**A**	.	.	**U**	.	.	.	.	.	.	.	**.**	.	.	**.**	.
26x-c19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**
26x-c33	.	**G**	.	.	.	**C**	**A**	**A**	**G**	.	.	.	.	**G**	.	.
26x-c19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c10												.	.	.	.	.
Lima																
26x-l12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-l26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**-**	**-**	.	.	.	.	.
26x-l4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-l28	.	**G**		.	.	**C**	**A**	**A**	**G**	.	.	.	.	.	**C**	.
26x-l33	.	**C**	**A**	.	.	**C**	**A**	**A**	**G**	.	.	**A**	**A**	**A**	.	.
26x-l22m												**A**	**A**	**.**	.	.
Pepino																
26x-p35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
25x-p3	.	**C**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**A**	.
26x-p26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**U**	**U**	.	.	.	.	.
26x-p44	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**U**	**.**	.	.	.	.	.

[1]Secuencia maestra en cada hospedante.

Tabla 12. Diferencias entre las variantes de secuencia en el aislado PM 26-X obtenidas a partir de tres hospedantes diferentes. *(Continuación)*

Variante de secuencia	Dominio T_R									Dominio V Cad. Inf.	Dominio C cadena inferior				
Cidro **/nt**	**126**	**133**	**145**	**146**	**151**	**154**	**158**	**160**	**167**	**187**	**198**	**208**	**210**	**214**	**220**
26x-c2	G	U	G	A	-	A	U	G	A	-	C	C	G	G	A
26x-c18	.	.	**C**	.	.	.	.	**A**	**.**	.	.	.	.	.	
26x-c13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**
26x-c29	**C**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c45	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.
26x-c22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	**.**	.	.	.	.	.
26x-c26	.	**C**	.	**G**	.	.	.	.	.	**.**	**G**	.	.	.	.
26x-c19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c11	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c33	.	.	.	.	**U**	**U**	.	.	.	**C**	.	**G**	**A**	.	**.**
26x-c19	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-c10	.	.	.	.	.	.	.	.	**G**						
Lima															
26x-l12	.	.	.	.	.	.	**C**	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-l26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-l4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-l28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		**G**	**A**	.	.
26x-l33	.	.	.	.	**U**	**-**	.	.	.	.		**G**	**A**	.	.
26x-l22m	.	.	.	.	**U**	**U**	.	.	.						
Pepino															
26x-p35	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	**A**	.
25x-p3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.
26x-p26	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
26x-p44	.	.	.	.	.	.	.	.	.						

Tabla 12. Diiferencias entre las variantes de secuencia en el aislado PM 26-X obtenidas a partir de tres hospedantes diferentes. *(Continuación)*.

Variante de secuencia	Dominio P cadena inferior						
Cidro **/nt**	**235**	**241**	**247**	**248**	**249**	**251**	**258**
26x-c2	U	U	U	U	U	G	C
26x-c18	.	.	.	.	**.**	**.**	**.**
26x-c13	.	.	.	.	.	.	.
26x-c23	.	.	.	.	.	.	.
26x-c29	.	.	.	.	.	.	.
26x-c45	.	.	.	.	.	.	.
26x-c22	.	.	.	.	.	.	.
26x-c26	.	**A**	.	.	.	.	.
26x-c19	.	-	.	.	.	.	.
26x-c11	.	.	.	.	.	.	.
26x-c33	.	**.**	**-**	**-**	**-**	**A**	**-**
26x-c10	.	.	.	.	.	.	.
Lima							
26x-l12	.	.	.	.	.	.	.
26x-l26	.	.	.	.	.	.	.
26x-l4	.	.	.	-	.	.	.
26x-l28	**C**	.	.	.	.	.	.
26x-l33	**.**	**.**	**-**	**-**	**-**	**A**	**-**
26x-l22m	**.**	**.**	**-**	**-**	**-**	**A**	**-**
Pepino							
26x-p35	.	.	.	.	.	.	.
25x-p3	.	.	.	.	.	.	.
26x-26	.	.	.	.	.	.	.
26x-p44	.	.	.	**U**	.	.	.

Tabla 13. Proporciones de variantes del HSVd informadas en hospedantes cítricos en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) que adoptan los grupos conformacionales identificados en las estructuras secundarias de mínima energía libre predichas para cada dominio estructural, atendiendo al carácter de patogenicidad.

Variante del HSVd en cítricos	Grupos conformacionales en cada dominio																			
	Dominio T_L			Dominio P					Dominio C			Dominio V						Dominio T_R			
	A	**B**	***ES***	**A**	**B**	**C**	**B_1[2]**	***ES***	**A**	**B**	***ES***	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	***ES***	**A_1[3]**	**A**	**B**	***ES***
Tipo CVd-IIb patogénica	26/49[a1]	15/49[b]	0.049	19/49[a]	14/49[a]	1/49[b]	-	0.027	12/49b	27/49[a]	0.049	23/49[a]	17/49[a]	-	-	-	0.049	11/49[a]	16/49[a]	15/49[a]	0.037
Tipo CVd-IIa no patogénica	17/30[a]	9/30[b]	0.063	-	17/30a	2/30[b]	5/30[b]	0.046	20/30[a]	6/30[b]	0.063	-	-	26/30[a]	1/30[b]	1/30[b]	0.059	-	28/30[a]	1/30[b]	0.049
Intermedio	7/13[a]	3/13[a]	0.095	1/13[b]	7/13[a]	-	2/13[b]	0.069	8/13[a]	1/13[b]	0.09	-	-	-	-	7/13	N.E.	-	2/13[b]	8/13[a]	0.095

[1]: El numerador indica la cantidad de variantes que adoptaron la conformación y el denominador el total de analizadas; letras diferentes señalan la existencia de diferencias significativas según la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998) para $p<0.05$ realizada dentro de cada tipo de variante para la adopción de las diferentes conformaciones en cada dominio. Se especifica el valor del error estándar (*ES*). -: no hubo ninguna variante que adoptara tal conformación. N.E.: no evaluado.[2]: subgrupo de la conformación P_B; [3]: subgrupo de la conformación T_{RA}.

Tabla 14 Principales características en la adopción de los grupos conformacionales por dominio de las variantes de HSVd en cítricos informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) a partir de la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998) para $p<0.05$.

Variante de HSVd en cítricos	Adopción de grupos conformacionales				
	Dominio T_L	**Dominio P**	**Dominio C**	**Dominio V**	**Dominio T_R**
Tipo CVd-IIb	- Adopta: **A^{a1}** y **B^b** y otros[2] - Tendencia: **A**	- Adopta: **A^a**, **B^a**, **C^b** y otros - Tendencia: **A** y **B** *- No adopta: B_1*	- Adopta: **A^b** y **B^a** y otros - Tendencia: **B**	- Adopta: **A^a**, **B^a** y otros - Tendencia: **A y B** *- No adopta: **C, D y E***	- Adopta: **A^a**, **A_1^a**, **B^a** y otros - Tendencia: **-**
Tipo CVd-IIa	- Adopta: **A^a** y **B^b** y otros - Tendencia: **A**	- Adopta: **B^a**, **C^b** y **B_1^b** - Tendencia: **B** - No adopta: ***A***	- Adopta: **A^a** y **B^b** y otros - Tendencia: **A**	- Adopta: **C^a, D^b, E^b** y otros - Tendencia: **C** *- No adopta: **A y B***	- Adopta: **A^a, B^b** y otros - Tendencia: **A** *- No adopta: **A_1***

Intermedio	- Adopta: $\mathbf{A}^{a}$ y $\mathbf{B}^{a}$ y otros - Tendencia: **-**	- Adopta: $\mathbf{A}^{b}$, $\mathbf{B}^{a}$, $\mathbf{B_1}^{b}$ y otros - Tendencia: **B** *- No adopta:* ***C***	- Adopta: $\mathbf{A}^{a}$ y $\mathbf{B}^{b}$ y otros - Tendencia: **A**	- Adopta: **E** y otros - Tendencia: **E** *- No adopta:* ***A, B, C y D***	- Adopta: $\mathbf{A}^{b}$, $\mathbf{B}^{a}$ y otros - Tendencia: **B** *- No adopta:* $\boldsymbol{A_1}$

[1]: Las letras en minúscula reflejan la existencia o no de diferencia significativa: letras diferentes indican la que la diferencia es significativa. [2]: El término **otros** se refiere a conformaciones poco representadas y que por lo tanto no constituyen grupos conformacionales.

Tabla 15. Proporciones de variantes del HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) que adoptan los grupos conformacionales identificados en las estructuras secundarias de mínima energía libre predichas para cada dominio estructural atendiendo al hospedante de origen.

Hospedante	**Grupos conformacionales en cada dominio**												
	Dominio T_L				**Dominio P**					**Dominio C**			
	A	**B**	**C**	***ES***	**A**	**B**	**C**	**D**	***ES***	**A**	**B**	**C**	***ES***
Cítricos	$43/88^{a1}$	$30/88^{b}$	-	0.034	$18/88^{b}$	$38/88^{a}$	$3/88^{c}$	-	0.024	$40/88^{a}$	$32/88^{a}$	-	0.037
Almendro[2]	-	1/2	-	N.E.	-	-	-	-	N.E.	-	-	2/2	N.E.
Albaricoquero	-	$16/25^{a}$	$6/25^{b}$	0.066	-	-	$2/25^{b}$	$11/25^{a}$	0.062	-	$8/25^{a}$	$6/25^{a}$	0.063
Pepino[2]	1/2	1/2	-	N.E.	-	2/2	-	-	N.E.	2/2	-	-	N.E.
Vid	$2/19^{b}$	$15/19^{a}$	-	0.081	-	-	11/19	-	N.E	-	17/19	-	N.E.
Lúpulo	$1/8^{b}$	$5/8^{a}$	-	0.121	-	$1/8^{b}$	$6/8^{a}$	-	0.124	$1/8^{b}$	$6/8^{a}$	-	0.124
Ciruela	-	$11/14^{a}$	$1/14^{b}$	0.094	-	-	$2/14^{b}$	$9/14^{a}$	0.089	-	-	9/14	N.E
Papa silvestre[2]	-	1/1	-	N.E	-	-	-	-	N.E.	-	1/1	-	N.E.

Hospedante	**Grupos conformacionales en cada dominio**									
	Dominio V						**Dominio T_R**			
	A	**B**	**C**	**D**	**E**	***ES***	**A**	**B**	**C**	***ES***
Cítricos	$20/88^{a}$	$17/88^{a}$ b	$26/88^{a}$	$8/88^{b}$	-	0.019	$45/88^{a}$	$24/88^{b}$	-	0.034
Almendro[2]	-	-	-	-	2/2	N.E.	-	-	2/2	N.E.
Albaricoquero	-	-	-	$1/25^{a}$	$3/25^{a}$	0.050	-	$11/25^{a}$	$11/25^{a}$	

Pepino[2]	-	-	-	1/2	-	N.E.	-	1/2	-	N.E.
Vid	-	-	-	2/19[b]	12/19[a]	0.078	-	-	14/19	N.E.
Lúpulo	-	-	-	-	6/8	N.E.	-	-	6/8	N.E.
Ciruela	-	-	-	-	12/14	N.E.	-	2/14[b]	12/14[a]	0.094
Papa silvestre[2]	-	-	-	-	1/1	N.E.	-	-	-	N.E.

[1]: El numerador indica la cantidad de variantes que adoptaron la conformación y el denominador el total de analizadas; letras diferentes señalan la existencia de diferencias significativas según la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998) para $p<0.05$ realizada dentro de cada hospedante para la adopción de las diferentes conformaciones en cada dominio. Se especifica el valor del error estándar (*ES*). -: no hubo ninguna variante que adoptara tal conformación. [2]: Para las variantes del HSVd en estos hospedantes no se hizo comparación de proporciones porque están representados solamente por una o dos secuencias. N.E.: no evaluado.

Tabla 16. Principales características en la adopción de los grupos conformacionales por dominio de las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003) obtenidas a partir de la prueba de comparación de proporciones múltiples (CENSA*soft*, 1998) para $p<0.05$.

Hospedante	Adopción de grupos conformacionales				
	Dominio T_L	**Dominio P**	**Dominio C**	**Dominio V**	**Dominio T_R**
Cítricos	- Adopta: **A**[a1] y **B**[b] y otros[2] - Tendencia: **A** y **B** *- No adopta:* ***C***	- Adopta: **A**[a], **B**[b], ***32***[c] y **C**[c] - Tendencia: **A** y **B** *- No adopta:* ***D***	- Adopta: **A**[a] y **B**[a] y otros - Tendencia: - *- No adopta:* ***C***	- Adopta: **A**[a], **B**[ab], **C**[a], **D**[b] y otros - Tendencia: **A, B y C** *- No adopta:* ***E***	- Adopta: **A**[a], **B**[b] y otros - Tendencia: **A** *- No adopta:* ***C***
Almendro[3]	- Adopta: **B** y otro - Tendencia: - *- No adopta:* ***A*** *y* ***C***	- Adopta: otros - Tendencia: - - No adopta: ***A, B, C*** *y* ***D***	- Adopta: **C** - Tendencia: - *- No adopta:* ***A y B***	- Adopta: **E** - Tendencia: - *- No adopta:* ***A, B, C*** *y* ***D***	- Adopta: **C** - Tendencia: - *- No adopta:* ***A*** *y* ***B***
Albaricoque	- Adopta: **B**[a], **C**[b] y otros. - Tendencia: **B** *- No adopta:* ***A***	- Adopta: **D**[a], **C**[b] y otros - Tendencia: **D** *- No adopta:* ***A*** *y* ***B***	- Adopta: **B**[a], **C**[a] y otros - Tendencia: - *- No adopta:* ***A***	- Adopta: **E**[a], **D**[a] y otros - Tendencia: - *- No adopta:* ***A, B*** *y* ***C***	- Adopta: **B**[a], **C**[a] y otros - Tendencia: - *- No adopta:* ***A***
Pepino[3]	- Adopta: **A** y **B** - Tendencia: - *- No adopta:* ***C***	- Adopta: **B** - Tendencia: - *- No adopta:* ***A, C*** *y* ***D***	- Adopta: **A** - Tendencia: - *- No adopta:* ***B*** *y* ***C***	- Adopta: **D** y otro - Tendencia: - *- No adopta:* ***A, B, C*** *y* ***E***	- Adopta: **B** y otro - Tendencia: - *- No adopta:* ***A*** *y* ***C***

Vid	- Adopta: **B**[a], **A**[b] y otro - Tendencia: **B** *- No adopta: **C***	- Adopta: **C** y otros - Tendencia: **C** *- No adopta: **A, B** y **D***	- Adopta: **B**[a] y otros - Tendencia: **B** *- No adopta: **A** y **C***	- Adopta: **E**[a], **D**[b] y otros - Tendencia: **E** *- No adopta: **A, B** y **C***	- Adopta: **E**[a] y **otros** - Tendencia: **C** *- No adopta: **A** y **B***
Lúpulo	- Adopta: **B**[a], **A**[b] y otros - Tendencia: **B** *- No adopta: **C***	- Adopta: **C**[a], **B**[b] y otro - Tendencia: **C** *- No adopta: **A** y **D***	- Adopta: **B**[a], **A**[b] y otro - Tendencia: **B** *- No adopta: **C***	- Adopta: **E**[a] y otros - Tendencia: **E** *- No adopta: **A, B, C** y **D***	- Adopta: **C**[a] y otros - Tendencia: **C** *- No adopta: **A** y **B***
Ciruela	- Adopta: **B**[a], **C**[b] y otros - Tendencia: **B** *- No adopta: **A***	- Adopta: **D**[a] y **C**[b] - Tendencia: **D** *- No adopta: **A** y **B***	- Adopta: **C**[a] y otros - Tendencia: **C** *- No adopta: **A** y **B***	- Adopta: **E**[a] y otro - Tendencia: **E** *- No adopta: **A, B, C** y **D***	- Adopta: **C**[a] y **B**[b] - Tendencia: **C** *- No adopta: **A***
Papa silvestre[3]	- Adopta: **B** - Tendencia: **-** *- No adopta: **A** y **C***	- Adopta: **otro** - Tendencia: **-** *- No adopta: **A, B, C** y **D***	- Adopta: **B** - Tendencia: **-** *- No adopta: **A** y **C***	- Adopta: **E** - Tendencia: **-** *- No adopta: **A, B, C** y **D***	- Adopta: **otro** - Tendencia: **-** *- No adopta: **A, B** y **C***

[1]: Las letras en minúscula reflejan la existencia o no de diferencia significativa: letras diferentes indican la que la diferencia es significativa. [2]: El término **otros** se refiere a conformaciones poco representadas y que por lo tanto no constituyen grupos conformacionales. [3]: Para las variantes del HSVd en estos hospedantes no se hizo comparación de proporciones porque están representados solamente por una o dos secuencias.

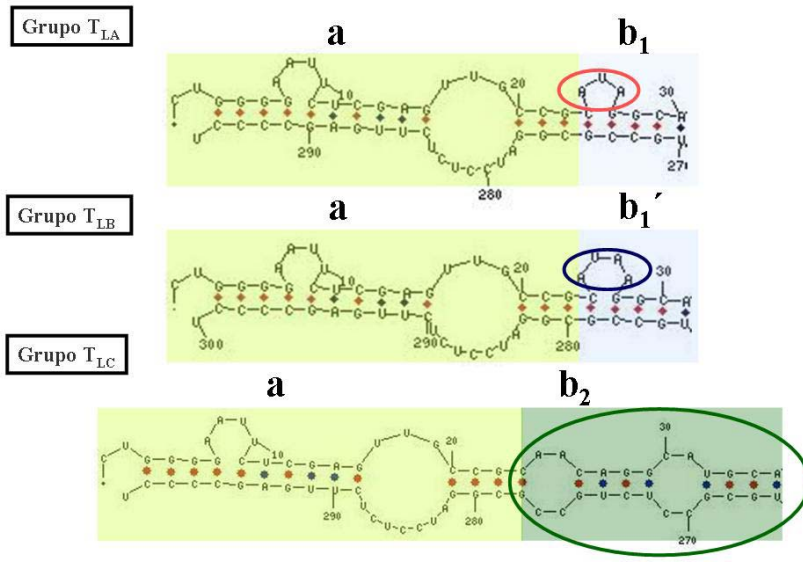


Figura13. Grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio terminal izquierdo (TL) adoptadas por las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

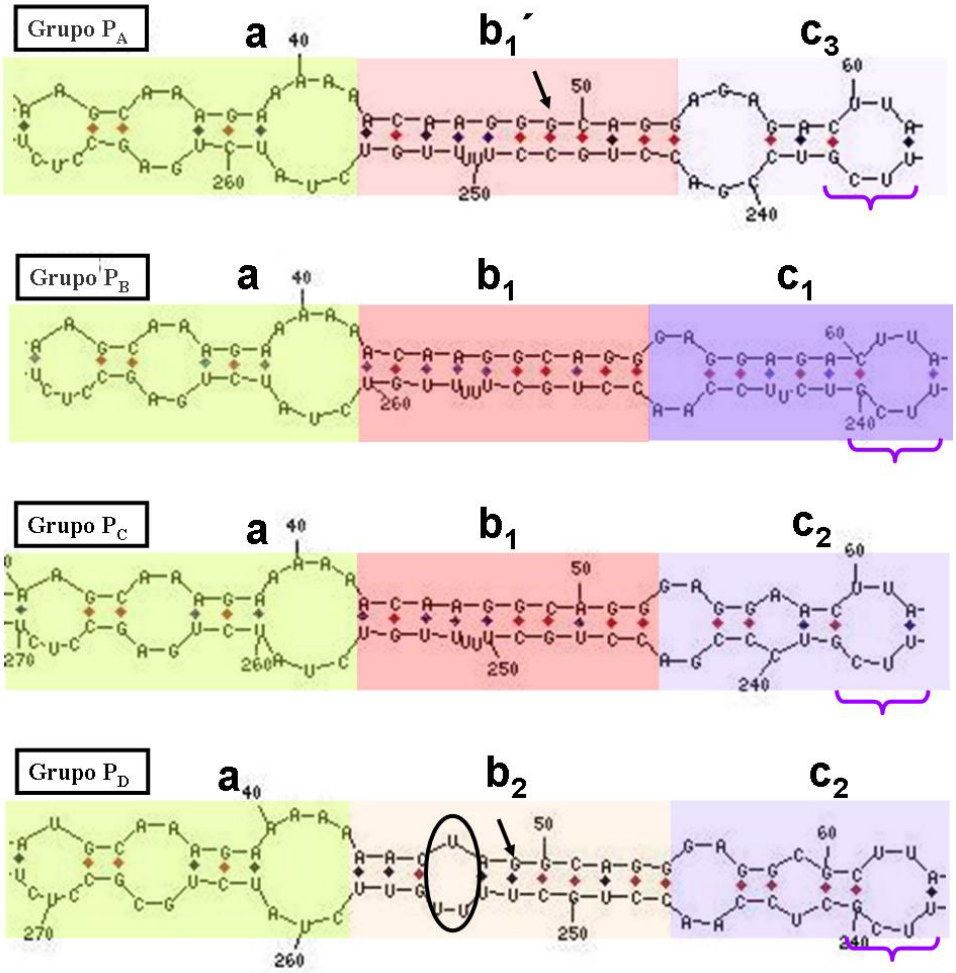


Figura 14. Grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio patogénico (P) adoptadas por las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

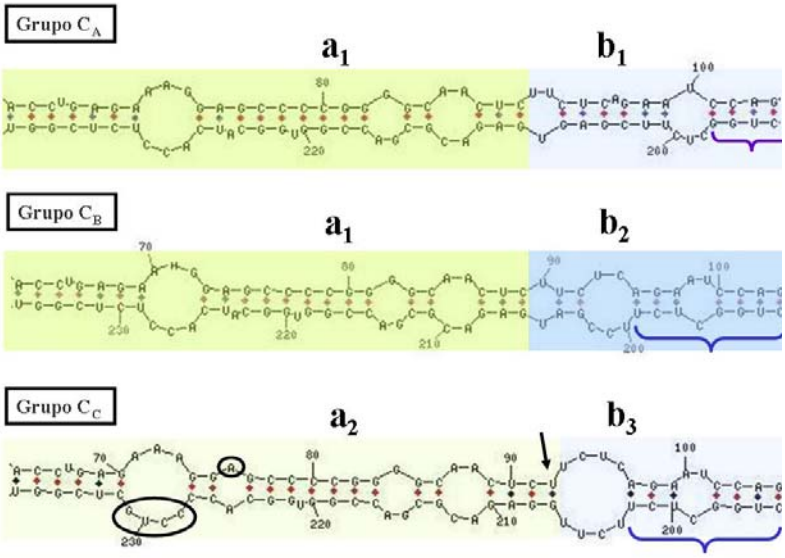


Figura15. Grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio central (C) adoptadas por las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

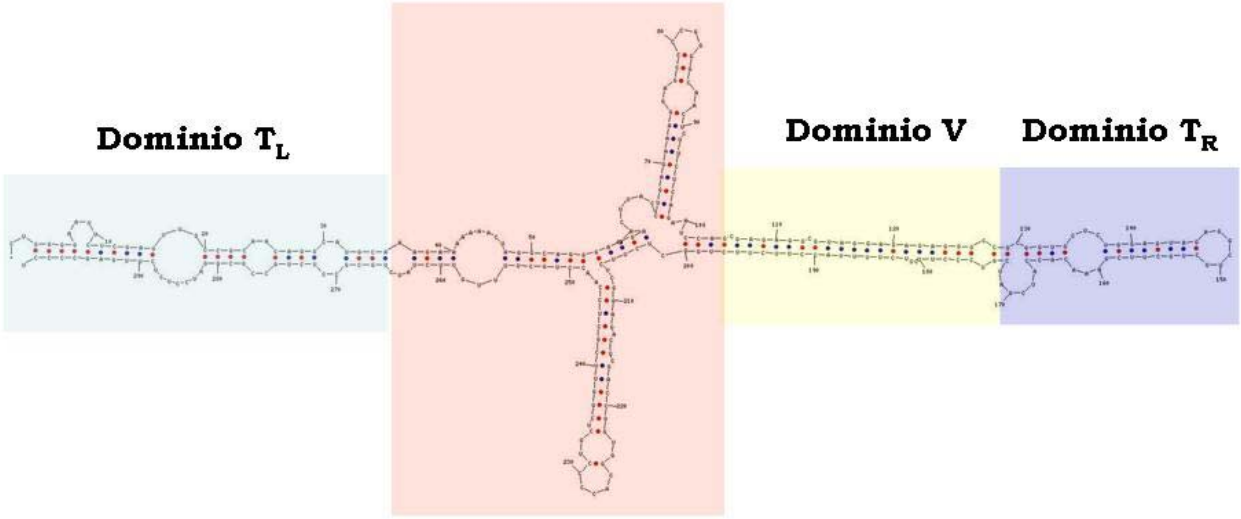


Figura 16. Estructura cruciforme adoptadas por algunas variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003). La zona del hacia el centro (sombreada en rojo) contiene a los nucleótidos pertenecientes a los dominios patogénico y central.

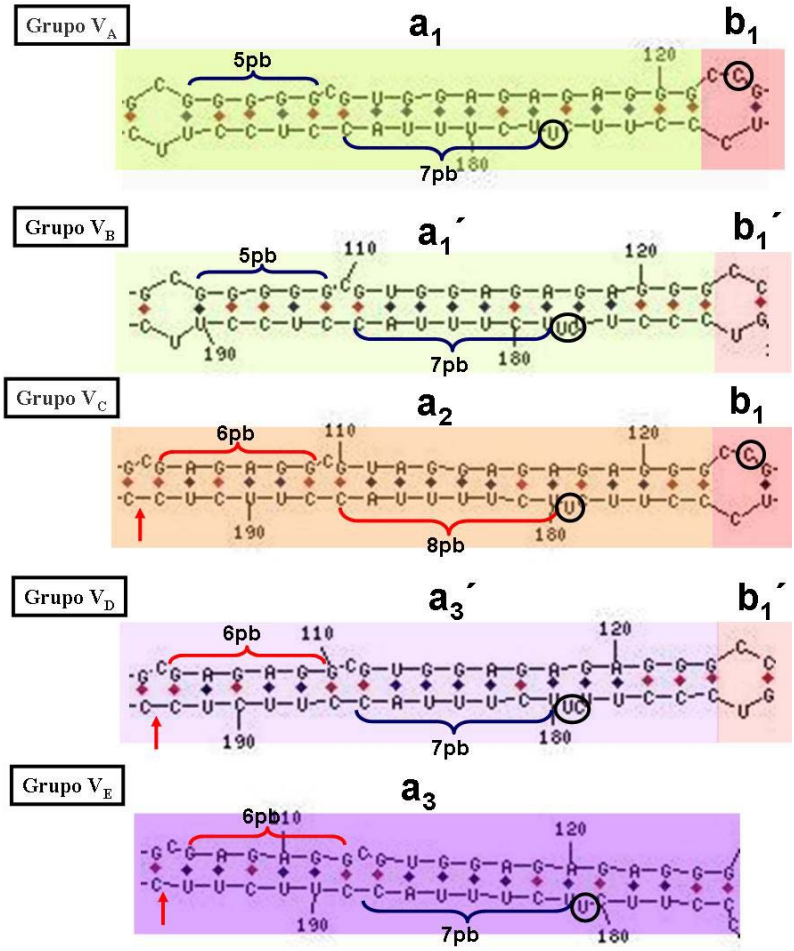


Figura 17. Grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio variable (V) adoptadas por las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

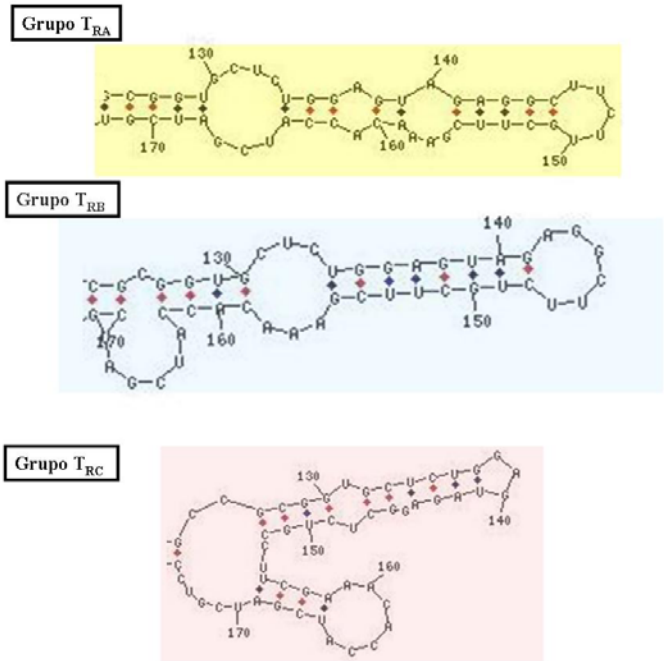
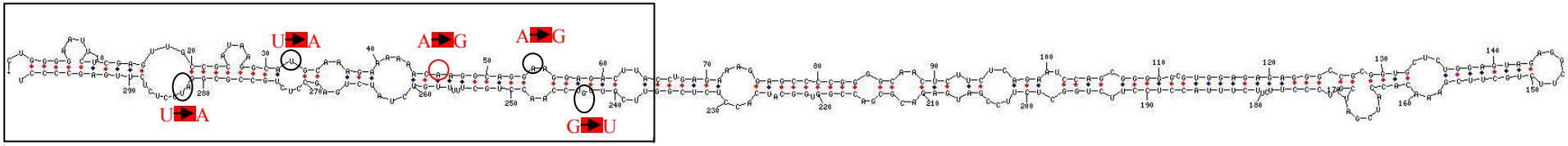


Figura 18. Grupos conformacionales de la estructura secundaria en el dominio terminal derecho (T_R) adoptadas por las variantes de HSVd informadas en la base de datos (Pelchat *et al.,* 2003).

A) HSVd.cit16

Dominios terminal izquierdo (T_L) y central (C)



B) HSVd.cit18

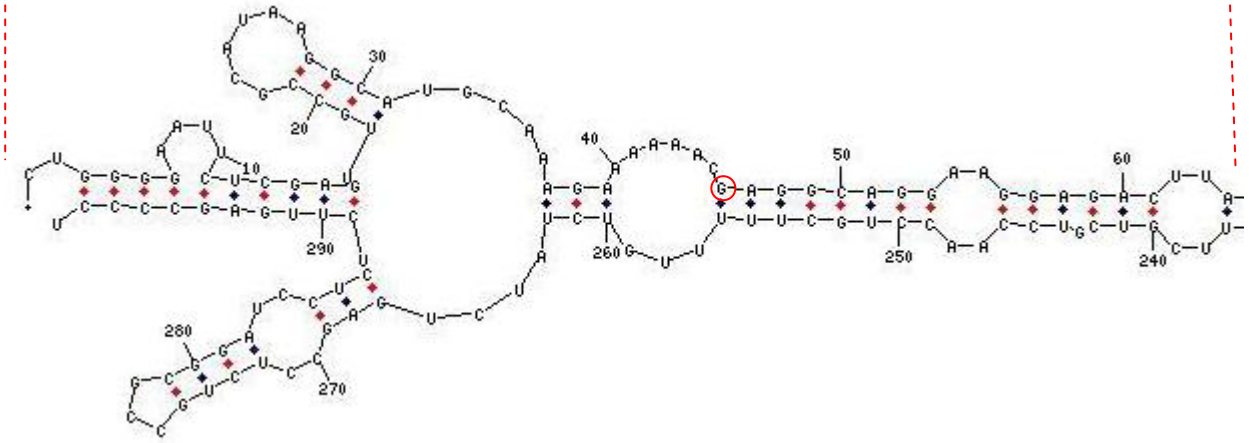
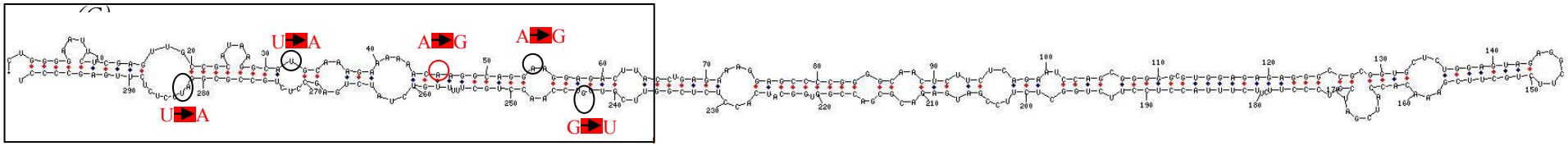


Figura 20. Estructuras secundarias de mínima energía libre obtenidas mediante el programa MFOLD (Zuker, 2003). **A)** Secuencia completa de la variante HSVd.cit16; los círculos en negro señalan los nucleótidos en los cuales hubo diferencias con la variante HSVd.cit19 y sobre ellos se indican tales cambios. Esta es la misma topología de la estructura secundaria para la variante HSVd.cit19. En rojo se indica el cambio que presentó en la secuencia con relación a la variante HSVd.cit18. **B)** Fragmento de la estructura secundaria de los dominios T_L y P para la variante HSVd.cit18; en rojo se señala el nucleótido en el cual difirió su secuencia con respecto a la variante HSVd.cit16; el resto de los dominios mantuvo la misma secuencia y estructura secundaria.

A) HSVd.cit16

Dominios terminal izquierdo (T_L) y central



B) HSVd.cit18

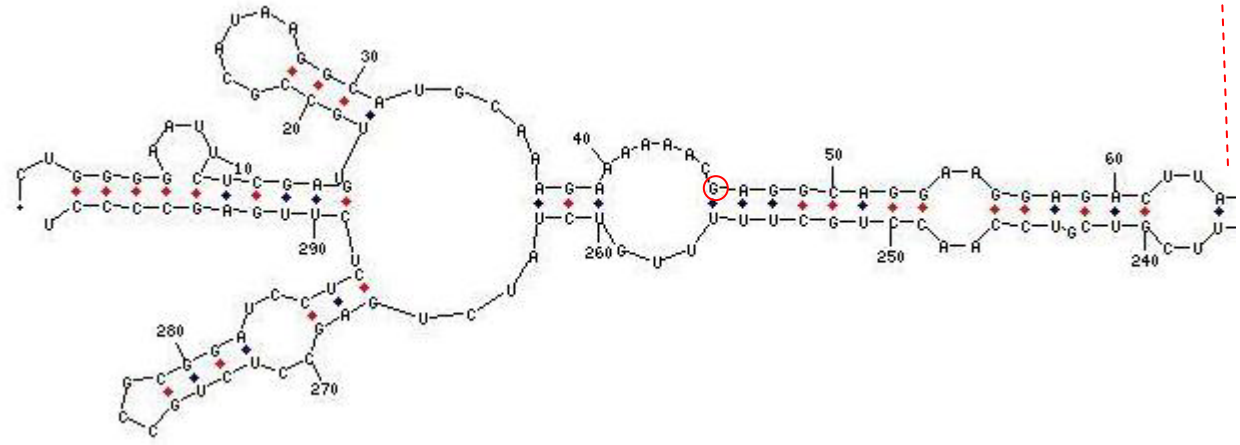


Figura 23. Estructuras secundarias de mínima energía libre obtenidas mediante el programa MFOLD (Zuker, 2003). **A)** Secuencia completa de la variante HSVd.cit16; los círculos en negro señalan los nucleótidos en los cuales hubo diferencias con la variante HSVd.cit19 y sobre ellos se indican tales cambios. Esta es la misma topología de la estructura secundaria para la variante HSVd.cit19. En rojo se indica el cambio que presentó en la secuencia con relación a la variante HSVd.cit18. **B)** Fragmento de la estructura secundaria de los dominios T_L y P para la variante HSVd.cit18; en rojo se señala el nucleótido en el cual difirió su secuencia con respecto a la variante HSVd.cit16; el resto de los dominios mantuvo la misma secuencia y estructura secundaria.